

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ADRIANA CORSETTI

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM O USO DE
CÉLULAS-TRONCO, ASSOCIADAS A IMPLANTE DE CIMENTO DE FOSFATO
DE CÁLCIO OU ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL**

PORTO ALEGRE

2012

ADRIANA CORSETTI

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM O USO DE
CÉLULAS-TRONCO, ASSOCIADAS A IMPLANTE DE CIMENTO DE FOSFATO
DE CÁLCIO OU ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Clínicas Odontológicas, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Linha de pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Titular Dra. Edela Puricelli

PORTO ALEGRE

2012

ADRIANA CORSETTI

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM O USO DE
CÉLULAS-TRONCO, ASSOCIADAS A IMPLANTE DE CIMENTO DE FOSFATO
DE CÁLCIO OU ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Clínicas Odontológicas, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Linha de pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia.

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA

Porto Alegre, 10 de outubro de 2012.

Orientadora: Prof^a. Titular Dra. Edela Puricelli

Profa. Dra. Nance Beyer Nardi

Profa. Dra. Susana Werner Samuel

Prof. Dr. Luis Alberto Santos

CIP - Catalogação na Publicação

Corsetti, Adriana

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM O USO DE CÉLULAS TRONCO, ASSOCIADAS A IMPLANTE DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO OU ESPONJA DE GELATINA ABSORVÍVEL / Adriana Corsetti. -- 2012.
75 f.

Orientadora: Edela Puricelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. células-tronco. 2. biomateriais. 3. regeneração óssea. 4. odontologia. 5. cirurgia bucomaxilofacial.
I. Puricelli, Edela, orient. II. Título.

**Aos meus queridos pais, que sempre serão minha inspiração.
Que dedicaram a vida para possibilitar a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos.**

A todos que, com carinho e dedicação, me apoiaram e
acreditaram nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Edela Puricelli**, por ser fonte inspiradora e exemplo de profissional. Ser Professora é muito mais do que transmitir o conhecimento. **É ensinar com dedicação e paciência, é abrir um sorriso e dizer: calma, você vai conseguir.** É agir com simplicidade e companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado por todos estes anos e, sempre, acreditar e confiar em mim.

À **toda minha família**, pelo amor incondicional. À **Janaina Iabel Machado**, que soube entender todos os momentos difíceis.

Aos **Profs. Dra. Deise Ponzoni, Dr. Ângelo Freddo, Dr. Carlos Eduardo Baraldi e Dr. Marcel Fasolo de Paris**, pelo carinho e amizade, pela parceria e ajuda.

Aos colegas do Centro de Odontologia da ISCMPA, **Dra. Denise Dubina, Dr. Gustavo Lisboa Martins, Dr. Felipe Artuzi, Dra. Letícia Boos, Prof. Dr. Fernando Daudt, Prof. Dr. Cassiano Rösing, Dr. Mauro Gomes Trein Leite, Dr. Henrique Azambuja, Dr. Mário Morganti, Dr. Alessandro Friedrich, Dra. Ludmila Moraes, Dra. Jaqueline Werner, Dr. Humberto Pucci, Dra. Jéssica Munaretto, Dra. Patrícia Wienandts, Dra. Roberta Ávila**, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos queridos, pelas mãos estendidas, sempre.

Aos meus queridos colegas e amigos, **Renan Langie e Vivian Ferreira**, pela ajuda neste trabalho.

Aos mestrados, **Viviane Pacheco e Jules Bemfica**, pela ajuda, pela confiança, pela amizade sempre. À aluna **Luisa Jardim**, pela presteza e carinho.

À **Dra. Nádia Arús**, pela brilhante ajuda nos exames por imagem.

À **Dra. Isabel Regina Pucci**, pela amizade e incentivo nesta caminhada.

À equipe do **Instituto Puricelli**, pelo carinho.

À Equipe da UEA, principalmente a **Enf. Marta Giotti Cioato, Dra. Fabíola Schons Meyer e Sra. Rosalina Braga** por tanta dedicação, pelo carinho e pela amizade.

Aos ex-alunos do Programa de Capacitação em CTBMF da FO-UFRGS, **Alessandra Junges e Rafael Braga**, que com tanta dedicação auxiliaram este experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Coordenador **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, ao diretor da faculdade, **Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**, e especial a **Srta. Adriana Aguiar**, pela ajuda e dedicação ao programa.

A **Profa. Dra. Heloísa Emília Dias da Silveira**, pelos ensinamentos e exemplo de profissional e professora.

A **Profa. Dra. Susana Werner Samuel**, por ter acreditado na minha capacidade e ter estado sempre junto a mim.

Ao **Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pelo auxílio e por acreditar na formação acadêmica em nosso país.

Ao **Prof. Dr. Luís Alberto Santos**, que com grande presteza confeccionou o material deste estudo; além do apoio e do incentivo.

À **Profa. Dra. Nance Nardi**, que esteve presente em todas as etapas do trabalho e por quem tenho grande admiração.

À **Profa. Dra. Melissa Camassola**, que muito gentilmente auxiliou nas etapas de obtenção das células tronco. À **Claudia Bahuschewskyj**, pelo apoio e auxílio na parte experimental deste estudo.

Às funcionárias do **Setor de Radiologia** desta faculdade, pela inestimável ajuda.

E à **Deus** por me proteger sempre e me guiar neste caminho.

*O importante da educação é o conhecimento
não dos fatos, mas dos valores.*

Dean William Inge

RESUMO

Proposição: este estudo busca avaliar, por resultado histológico, e por imagem, o reparo ósseo baseado na aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAD), através do preenchimento das cavidades cirúrgicas com bloco de cimento de α -fosfato tricálcico (α -CFtC) e esponja de gelatina absorvível (EGA). **Metodologia:** foram utilizados 32 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR, isogênicos, divididos em quatro grupos, com sete, 14, 30 e 60 dias de pós-operatório. Na diáfise óssea de cada fêmur direito, houve a confecção de duas cavidades críticas ósseas, sendo designadas: Controle 1 (C1) ou Teste 1 (T1), localizados na porção proximal ou superior do fêmur, e Controle 2 (C2) ou Teste 2 (T2), localizado na porção central do fêmur. No leito T1 foi implantado o bloco de α -CFtC, pré-incubado com células-troncos mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAD), e em T2, fragmento de EGA associada, no transcirúrgico, às células-tronco (CTAD). No leito C1, foi implantado o bloco de α -CFtC, e no leito C2, fragmento de EGA. Os leitos C1 e C2 não receberam as células-tronco. Avaliou-se o reparo ósseo, comparativamente entre os grupos estudados, através de análise visual por escores de exames por imagem (Radiografia e Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico - TCFC) e através de análise histomorfométrica dos cortes histológicos. **Resultados:** A análise visual por escores dos exames por imagem, não revelou diferença estatística significativa na Radiografia, porém, nas TCFC, observou-se melhores escores para reparo ósseo nos Grupos Testes, que receberam as células-tronco. Aos sete e 60 dias pós-operatórios, observou-se que no Grupo Teste, que utilizou o bloco de α -CFtC, houve uma aceleração no processo de reparo ósseo, com maior neoformação óssea e maior preenchimento da cavidade. O mesmo observou-se na cavidade do Grupo Teste que continha o EGA com associação de células-tronco, aos 14 dias pós-operatórios. No Grupo Controle que recebeu o EGA, de 14 e 30 dias, observou-se intensa fibroplasia, o que não foi verificado nos demais grupos. **Conclusões:** a radiografia que utiliza filme dental não revelou diferença entre os grupo estudados, porém os resultados da análise por escores (TCFC) mostraram uma aceleração no processo de reparo ósseo nos grupos testes. A utilização de células-tronco, associadas aos biomateriais (α -CFtC e EGA), mostrou aceleração do processo de reparo ósseo, em ratos, quando comparadas às cavidades sem células. As cavidades preenchidas com EGA, que não receberam células-tronco, quando comparadas com as cavidades que receberam as CTAD, aos 14 e 30 dias, apresentaram intensa fibroplasia e conseqüente atraso na ossificação endóstea.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Biomateriais. Células-tronco.

ABSTRACT

Aims: this research aims to describe, through a histological analysis and imaging study, the quality of bone healing under adipose mesenchymal stem cells application (CTAD), with α -CFtC implant and absorbable gelatin sponge (EGA). **Methodology:** were studied 32 strain rats *Rattus norvegicus albinus*, SHR (spontaneously hypertensive rats), isogenics, divided into four groups: seven, 14, 30 and 60 postoperative days. In the right femoral diaphysis, two drilled cavities were created: Control 1 (C1) or Test 1 (T1), in the proximal portion of the femur, and Control 2 (C2) or Test 2 (T2), in the central portion of the femur. T1 was filled with α -CFtC block incubated with mesenchymal stem cells, and T2 was filled with EGA associated to the cells (CTAD). C1 was filled with α -CFtC block and C2 with EGA, both without cell engineering. Results of bone repair were analysed by imaging study (X-Ray and TCFC) and histomorphometry. **Results:** The visual X-ray test does not show any statistical difference between experimental groups. However, visual TCFC test showed better results in Tests Groups. Seven and 60 days: Test Group – in T1 (α -CFtC) was observed bone healing acceleration, with a statistical difference between experimental groups. The same was observed in 14 days, in Test Group – T2 (EGA). Contrasting with this, the Groups with EGA (C2) - 14 and 30 postoperative days - showed intense fibroplasy. **Conclusions:** the X-ray does not show any statistical difference between experimental groups, but TCFC images showed bone healing acceleration in Tests Groups. The mesenchymal cell application, associated to biomaterials (α -CFtC and EGA) showed acceleration in the bone healing process, in rats, when compared with cavities from the Control Groups. The cavities C2 (EGA - without cell therapy), in 14 and 30 postoperative days, developed an intense fibroplasy and showed delay bone healing process.

Keywords: Bone regeneration. Biomaterials. Mesenchymal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dimensões do bloco de cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico (α -CFtC), para implantação em cavidades ósseas cirurgicamente criadas. Observe a estrutura porosa do material	33
Figura 2 – (A) Tricotomia, antissepsia com iodoform aquoso e anestesia local; (B) incisão em pele	33
Figura 3 – (A) Acesso a diáfise do fêmur direito; porção proximal (P) e porção distal (D); (B) ostectomia sob irrigação contínua; broca trefina (à direita)	34
Figura 4 – Transoperatório dos Grupos Testes	34
Figura 5 – Transoperatório dos Grupos Controles	35
Figura 6 – Imagem de TCFC dos fêmures do presente estudo	35
Figura 7 – Padrão utilizado para análise visual por escores, de TCFC, dos fêmures do presente estudo.....	37
Figura 8 – Lâmina histológica corada com HE do Grupos Testes - Sete dias	40
Figura 9 – Fratura dos fêmures com 14, 30 e 60 dias pós-operatórios.....	42
Figura 10 – Radiografias perfil dos fêmures com sete e 60 dias pós-operatórios, das amostras C4 e C15.....	43
Figura 11 – Radiografias pósterio-anteriores dos fêmures sete e 60 dias pós-operatórios, das amostras T15 e T5	43
Figura 12 – TCFC em cortes sagitais, de sete e 60 dias pós-operatórios, dos grupos controles e Testes.....	45
Figura 13 – TCFC, estudo em 3D – Fêmur T9, 7 dias	45
Figura 14 – Sete dias pós-operatórios	47
Figura 15 – Cavidades T1 e T2, sete dias pós-operatórios (aumento 100x)	48
Figura 16 – 14 dias pós-operatórios	49
Figura 17 – Cavidade T1 (cimento de fosfato de cálcio + CTAD), 14 dias pós-operatórios (aumento 100x).....	50
Figura 18 – Cavidade C2 (EGA sem CTAD), 14 dias pós-operatórios (aumento 100x).....	50
Figura 19 – 30 dias pós-operatórios	52

Figura 20 – Cavidade T2 (com EGA + CTAD), 30 dias pós-operatórios (aumento 100x)	53
Figura 21 – 60 dias pós-operatórios	54
Figura 22 – Cavidade T2 (EGA + CTAD), 60 dias pós-operatórios (aumento 100x)	55
Figura 23 – Gráfico de comparação da análise da oclusão das cavidades, entre grupos testes e controles, com α -CFtC e EGA, nos tempos experimentais de sete, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Demonstração da divisão dos animais por tempo e grupos.....	28
Tabela 2 – Análise visual dos exames de imagem, por escore.....	44
Tabela 3 – Comparação da análise histomorfométrica entre testes e controles com, α -CFtC, aos sete, 14, 30 e 60 dias	57
Tabela 4 – Comparação da análise histomorfométrica, entre testes e controles, com EGA, aos sete, 14, 30 e 60 dias.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BMP	proteína morfogenética óssea
CSD	critical size defect (defeito ósseo crítico)
CTAD	células-tronco derivadas do tecido adiposo
CTMs	células-tronco mesenquimais
DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - hidrogenofosfato de cálcio diidratado; fosfato dicálcico diidratado; brushita
DPSCs	CTMs derivadas da polpa dentária
EGA	Esponja de gelatina absorvível
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - hidroxiapatita
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium/meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco com HEPES
HE	hematoxilina e eosina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfônico
MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - dihidrogeno fosfato de cálcio monoidratado; fosfato monocálcico monoidratado
nHAC/PLA	hidroxiapatita, colágeno e poli (ácido lático)
PLLA	poli (ácido lático)
rhBMP	proteína morfogenética óssea recombinante humana
SHR	spontaneously hypertensive rats/ratos espontaneamente hipertensivos
TC	Tomografia Computadorizada
TCFC	Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico
TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - fosfato tricálcico
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento – beta
TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ - fosfato tetracálcico
UEA	Unidade Experimental Animal
VEGF	Fator de Crescimento de Endotélio Vascular
α -CFtC	cimento de alfa fosfato tricálcico (SANTOS, 2002)
α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - alfa-fosfato tricálcico
β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - β -tricalciofosfato
μm	micrometro(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 TECIDO ÓSSEO	17
2.2 REPARO ÓSSEO	17
2.3 OSTEOTOMIA E OSTECTOMIA	19
2.4 BIOMATERIAIS	19
2.4.1 Fosfato de cálcio	20
2.5 EXAMES POR IMAGEM	21
2.5.1 Radiografia	21
2.5.2 Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC)	21
2.6 HISTOMORFOMETRIA	22
2.7 ENGENHARIA DE TECIDOS	23
3 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 PARADIGMA	27
4.2 TIPO DE ESTUDO	27
4.3 LOCAL	27
4.4 HIPÓTESE	27
4.5 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS	27
4.6 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	28
4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.8 EXAMES POR IMAGEM	36
4.8.1 Estudo radiográfico	36
4.8.2 Estudo tomográfico	37
4.8.3 Análise por escores	37
4.9 ESTUDO HISTOLÓGICO	38
4.9.1 Histomorfometria	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
5 RESULTADOS	42
5.1 RESULTADO EXAMES POR IMAGEM	42
5.1.1 Estudo radiográfico	42

5.1.2 Análise visual por escores	43
5.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DESCRITIVO	46
5.2.1 Histomorfometria	55
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A – BROCAS TREFINA, DE 3,1MM DE DIÂMETRO EXTERNO E 2,5MM DE DIÂMETRO INTERNO	73
ANEXO B – RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97	74
ANEXO C – CÓDIGO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AOS ANIMAIS	75
ANEXO D – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	77

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo. Quando lesado, possui uma capacidade única de reparo sem a presença de cicatrizes. Porém, em alguns casos, faz-se necessária a reconstrução com enxertos ósseos ou substitutos. Em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, o osso é o tecido mais comumente utilizado nas cirurgias de trauma, pré-protéticas, oncológicas e no tratamento de defeitos congênitos.

A necessidade terapêutica fez com que o homem desenvolvesse formas de substituir os tecidos lesados. Das descobertas arqueológicas aos estudos experimentais, citamos pedras ígneas e marfim em esqueletos mumificados, o implante de placa de ouro em crânio em meados do século XVI. No século XIX, o uso de prata (1827), platina (1829), e, no desenrolar do século XX, materiais como aço inoxidável (1912), cobalto (1936), as cerâmicas de óxido de alumínio (1962), a sinterização das hidroxiapatitas e dos fosfatos de cálcio (década de 1970) e os implantes de titânio (1977).

No contexto da reconstrução bucomaxilofacial, o enxerto ósseo autógeno é considerado “padrão ouro” para substituição do tecido perdido, porém apresenta limitações como morbidade do sítio doador, reabsorção, exigência de maior tempo cirúrgico, dificuldade de conformação exata ao defeito e indisponibilidade de quantidade necessária em muitos casos. Além disso, os progressos na técnica cirúrgica para obtenção dos enxertos não competem com a evolução laboratorial para obtenção de materiais aloplásticos.

O processo de neoformação óssea é fundamental para o sucesso das intervenções clínico-cirúrgicas odontológicas. Neste sentido, as principais estratégias de pesquisa objetivam somar ao aprimoramento de técnicas cirúrgicas bucomaxilofaciais o maior conhecimento e domínio dos biomateriais e seus possíveis desdobramentos químicos e físicos.

Mais recentemente, o conceito do uso das células tronco-progenitoras adultas introduziu novas perspectivas no tratamento da reparação tecidual. As células-tronco mostram capacidade de diferenciação praticamente pluripotente, incluindo a diferenciação em uma ampla gama de células de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica. Como essas células podem ser facilmente coletadas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, esse novo conceito abre amplas possibilidades de uso em terapia regenerativa, em sistemas autólogos e, portanto, isentos de rejeição imunológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o mais desenvolvido tecido conjuntivo de sustentação e é composto de duas matrizes.¹ A matriz orgânica é composta de 90-95% de colágeno, sendo o restante um meio homogêneo denominado substância fundamental. A matriz inorgânica tem como principal componente a hidroxiapatita (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – um cristal formado no processo de mineralização da matriz colágena.²

Este tecido é constituído basicamente de três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são as células responsáveis pela secreção de colágeno tipo I, componente principal da matriz orgânica e que constitui a camada osteóide. Os sais de cálcio precipitam-se, formando sobre essa matriz, os cristais de HA e mineralizando o tecido. Os osteócitos são as células osteoblásticas circundadas durante a secreção e mineralização da matriz óssea. Apresentam reduzida atividade metabólica, mas são fundamentais para a manutenção desta matriz. Os osteoclastos são células gigantes, móveis e ramificadas que podem apresentar de seis a 50 núcleos. Sua atividade é a reabsorção, formando cavidades conhecidas como Lacunas de Howship.²

O tecido ósseo é revestido, em sua maior parte, pelo perióstio. A camada interna do perióstio é constituída por células osteoprogenitoras capazes de se multiplicar por mitose e se diferenciar em osteoblastos.² O tecido ósseo sofre 3 processos ao longo da vida: modelamento – adquire forma; reparo – responde à fratura; e remodelamento – processo contínuo que se mantém na vida adulta e vai reduzindo seu ritmo com o envelhecimento.³

2.2 REPARO ÓSSEO

O objetivo do reparo ósseo é restaurar a continuidade entre as margens da ferida, restabelecendo as características morfofuncionais do órgão ou tecido afetado. Na regeneração óssea, o tecido lesado se auto substitui, não havendo a formação de uma cicatriz. Assim, após uma fratura óssea, quando cessam os processos reparativos, forma-se um novo osso no local original da fratura, não havendo mais evidência da lesão anterior.⁴

Burkitt, Young e Heath⁵ propuseram a fratura como modelo de reparo ósseo. Neste, a neoformação óssea é tanto intramembranosa como endocondral. Na ossificação

intramembranosa, o mineral é depositado diretamente em um tecido mesenquimal, enquanto, na ossificação endocondral, um modelo de cartilagem é substituído por osso.

Diversos autores descrevem basicamente três estágios fisiológicos do reparo ósseo: inflamatório, fibroblástico e de remodelamento. Logo após a fratura, ocorre a formação de um coágulo devido à ruptura dos vasos do periósteo, osso e medula. Segundo Junqueira e Carneiro,² o estágio inflamatório dura de três a cinco dias, e é dividido em duas fases, a vascular e a celular. Uma vasoconstrição inicial forma o coágulo e, após, a histamina e as prostaglandinas causam vasodilatação, possibilitando a passagem do plasma e leucócitos através das células endoteliais. Células inflamatórias migram para o local da fratura acompanhadas por angiogênese e proliferação celular.

No estágio fibroblástico, as células osteogênicas diferenciam-se em fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos.⁶ Segundo Chalmers, Gray e Rush,⁷ as células osteogênicas ou estão presentes no local da lesão, ou são derivadas de tecidos conjuntivos precursores. Os fibroblastos e osteoblastos produzem então matriz fibrosa, formando o calo ósseo. Há a deposição de matriz osteóide que será gradativamente calcificada e transformada em tecido ósseo primário.

O último estágio (remodelamento) inicia-se com a união clínica e radiográfica do osso e termina com a restauração do seu aspecto inicial e do canal medular. Histologicamente, o tecido ósseo primário é reabsorvido pelos osteoclastos e substituído por osso lamelar, processo que pode variar de meses a anos para se completar.⁸ Todo processo de reparo ósseo, em ratos, foi descrito por Puricelli et al.,⁹ e Corsetti¹⁰.

O tecido ósseo tem alta capacidade de reparo, mas apresenta limitações, pois defeitos muito grandes são rapidamente preenchidos com tecido conjuntivo. O bloqueio da neoformação óssea exercido pelo tecido conjuntivo dá-se pela sua maior taxa de proliferação e migração celulares.¹¹

Schenk et al. têm proposto técnicas baseadas nos princípios de osteocondução, regeneração óssea guiada, distensão do calo ósseo e osteoindução, para que ocorra o reparo de pequenos defeitos em osso cortical ou medular. A técnica baseada na osteocondução preconiza a colocação de um material de preenchimento no defeito ósseo. Este funciona de arcabouço para a proliferação das células ósseas.¹²

2.3 OSTEOTOMIA E OSTEECTOMIA

Puricelli¹³ conceitua a osteotomia como preparo cirúrgico do osso que permite a reposição fragmentada ou integral do mesmo em seu sítio. A ostectomia envolve o corte do tecido ósseo sem a intenção de sua conservação ou reaproveitamento.

Diversos são os meios utilizados para realização do corte ósseo, entre eles as serras cirúrgicas e as brocas. As brocas tipo trefina permitem determinação da dimensão do corte ósseo. Podem variar no diâmetro e profundidade da cavidade a ser construída. Portanto é muito utilizada na pesquisa cirúrgica, pois permite a padronização do tamanho crítico do defeito ósseo.¹⁴

Frame¹⁵ relatou que, em todo estudo experimental, deve ser determinado o defeito de tamanho crítico (CSD). O CSD é definido como o menor defeito intraósseo sem reparo espontâneo durante a vida do animal. Dessa forma, quando objetiva-se o reparo ósseo completo, deve-se optar por dimensões menores ao CSD determinado. Caso contrário, haverá a formação de tecido fibroso ao invés de tecido ósseo.

Baseando-se nos referidos estudos, Schmitz e Hollinger¹⁶ realizaram uma revisão de literatura e sugeriram um protocolo experimental, visando padronização do modelo animal. Porém, não houve determinação quanto às dimensões de defeitos em diáfises de fêmures de ratos.

Em 2003, segundo modelo de Puricelli, Ulbrich¹⁷ estudou o reparo ósseo sob o efeito permanente de campo magnético sepultado *in vivo*. As cavidades cirurgicamente criadas em fêmures de ratos mediam 2mm de diâmetro e 4mm de espessura. Havia a ruptura apenas de uma cortical, permitindo assim a estabilidade da estrutura e imobilização da ferida óssea. Em 2010, Puricelli et al.⁹ utilizaram cavidades de igual tamanho. A dimensão, idealizada pelas autoras nos dois estudos, reproduziu resultados compatíveis com reparo ósseo em primeira intenção.

2.4 BIOMATERIAIS

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas de 1982, entende-se por biomaterial: “toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que, durante um período de tempo indeterminado, é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais.”¹⁸

Um material de implante precisa atender alguns requisitos fundamentais como:

- a) ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- b) ser inócuo, ou seja, não deve ser degradado pelos tecidos, como, por exemplo, corrosão em metais;
- c) ser biofuncional, ou seja, deve ter as características adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- d) ser esterilizável.

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e exitoso da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta característica está embutida no conceito de biofuncionalidade.¹⁹

2.4.1 Fosfato de cálcio

Os cimentos de fosfato de cálcio apresentam uma série de vantagens, sendo a biocompatibilidade e a bioatividade as mais relevantes.²⁰⁻²⁶

O primeiro cimento de fosfato de cálcio comercial desenvolvido se deve a Legeros et al.²⁷ A partir da mistura de pós de fosfato tetracálcico (TTCP) e fosfato dicálcico (DCPD) com água, obtiveram a precipitação de finos cristais de HA, cujo entrelaçado proporciona a resistência mecânica do material resultante.

Baseando-se na literatura, Santos,²⁸ em 2002, desenvolveu uma composição de cimento de fosfato de cálcio baseada no α -fosfato tricálcico (α -CFtC). Modificações foram introduzidas na composição do cimento para permitir a incorporação de poros na estrutura através da adição de surfactante lauril sulfato de sódio, e, assim, permitir o crescimento de tecido ósseo para o interior do material.

A base deste cimento, utilizado na forma de blocos pré-curados, foi testada por Puricelli et al.⁹ Os resultados demonstraram que o cimento estudado responde a biocompatibilidade e osteotransdutividade, acelerando o processo de neoformação óssea já no período de sete dias.

2.5 EXAMES POR IMAGEM

2.5.1 Radiografia

A Radiografia que utiliza filme dental é indicada para estudos individuais ou de grupos de dentes. Ela proporciona, através de uma imagem bi-dimensional, um visão da anatomia dentária (coroa e raiz) e das estruturas que circundam o dente. Em estudos experimentais, esta radiografia é utilizada para identificação de fraturas e como auxiliar na identificação das áreas de reparo ósseo.²⁹

2.5.2 Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC)

O advento da TCFC permitiu a obtenção de um tomógrafo relativamente pequeno e de menor custo. Maki et al.,³⁰ em 2003, publicam que os programas de TCFC, da mesma forma que a Tomografia Computadorizada (TC), permitem a reconstrução multiplanar do volume escaneado, ou seja, a visualização de imagens axiais, coronais, sagitais e oblíquas, assim como a reconstrução em 3D. Apresenta ainda a função denominada reconstrução multiplanar em volume, que constitui outra importante vantagem da TCFC. O volume total da área escaneada apresenta um formato cilíndrico, de tamanho variável, de acordo com o fabricante do aparelho, e compõe-se unitariamente pelo *voxel*. Na TCFC, o *voxel* é chamado de isométrico, ou seja, apresenta altura, largura e profundidade de iguais dimensões.

Ludlow et al.,³¹ em 2007, avaliaram a acurácia de medidas mandibulares em TCFC nos modos axial e panorâmico reformatado, em três diferentes posicionamentos de cabeça. Para tal, foram utilizados 28 crânios secos, previamente preparados para medidas verticais e horizontais, através da localização pré-determinada de fios metálicos ortodônticos. As medidas reais foram realizadas com paquímetro digital. A partir dos resultados, os autores puderam concluir que não houve alteração na acurácia das aferições em relação à posição da cabeça e que as aferições nas imagens bi e tridimensionais da anatomia mandibular são precisas.

Ballrick et al.,³² em 2008, avaliaram a distorção de imagem e resolução espacial do aparelho de TCFC i-CAT. Para avaliar a distorção e acurácia de medições, os autores construíram um modelo em acrílico contendo marcadores metálicos em cromo com 0,3mm de diâmetro, nos três planos do espaço, distantes entre si 5mm. Foram realizados escaneamentos

completos nas 12 programações diferentes do aparelho. As medidas foram realizadas utilizando-se imagens no formato DICOM, através do *software* Accurex. No modelo também foram realizadas aferições com um paquímetro digital. As medidas manuais e do computador foram estatisticamente diferentes, mas a diferença absoluta foi menor que 0,1mm, o que os autores consideram clinicamente irrelevante para a maioria das aplicações. Por tal, concluíram que este aparelho tem medidas clinicamente acuradas e resolução aceitável.

Loubele et al.,³³ 2008, avaliaram a qualidade de imagem em relação à dose de radiação de quatro aparelhos de TCFC. Para as aferições foram utilizados um modelo de crânio, escaneado à laser, e um modelo cilíndrico contrastado composto de polimetilmetacrilato, tecido ósseo e ar. Quatro aparelhos de TCFC foram utilizados neste estudo: Accuitomo, Mercuray, NewTom 3G e i-CAT. Como estudo controle, foi utilizado o aparelho de TC Sensation 16. Os autores concluíram que a melhor relação entre qualidade de imagem e dose de radiação foi encontrada no aparelho i-CAT.

2.6 HISTOMORFOMETRIA

Os estudos recentes mostram diversas formas de mensuração com dados estatísticos das regiões estudadas, aumentando assim, sua confiabilidade. Em estudo de 2011, os autores³⁴ utilizaram matrizes de nanofibras de poli (ácido láctico) (PLLA), associadas à BMP-2 para reconstrução de defeitos ósseos em calvárias de ratos. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina/Eosina e Tricrômico de Masson. Os autores obtiveram nove imagens de cada espécie e a quantidade de osso neoformado foi calculada em porcentagem em relação à área de cada secção do defeito total.

Dinarvand et al.,³⁵ em 2011, estudando aplicação de nanofibras de poli (ácido láctico) (PLLA) associado a partículas de HA, vidro bioativo e TCP em reparo ósseo, utilizaram como coloração dos cortes histológicos de calvária de ratos a HE, e a quantidade de osso neoformado foi calculada através de imagens e demonstrada por porcentagem em relação à área de cada secção do defeito total.

Zhao et al.,²⁹ em 2011, estudaram o reparo ósseo em rádio de coelhos, utilizando enxerto ósseo autógeno associado a CTMs. Os autores utilizaram coloração histológica por HE e realizaram duas mensurações: porcentagem de osso neoformado em relação ao defeito total e a quantidade de vasos neoformados por campo.

2.7 ENGENHARIA DE TECIDOS

Nos últimos anos, o conceito do uso da célula-tronco de origem embrionária introduziu novas perspectivas no tratamento celular de patologias teciduais. A possibilidade de cultivo de células progenitoras embrionárias (*embryonic stem cells* – ESC) humanas a partir de blastocistos obtidos por fecundação *in vitro* permitiu propor transplantes de células embrionárias totipotentes em tecidos degenerados, conseguindo uma regeneração *in situ* de populações celulares funcionais. Existe uma via alternativa ao uso de células embrionárias, visto que o organismo adulto possui uma reserva de células-tronco-progenitoras pluripotentes.³⁶ A fonte mais ampla é aparentemente a medula óssea, cujas células-tronco mostram capacidade de diferenciação totipotente, incluindo (em modelos animais) a diferenciação em uma ampla gama de células de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica. Como essas células podem ser facilmente coletadas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, esse novo conceito abre amplas possibilidades de uso em medicina regenerativa, em sistemas autólogos e, portanto, isentos de problemas de rejeição imunológica.³⁷

Além das células progenitoras medulares, vários tecidos guardam a reserva interna de células pouco diferenciadas com capacidade de regeneração. As células satélites das fibras musculares esqueléticas são um dos exemplos clássicos, assim como os pericitos pericapilares. Estudos recentes mostram que, embora engajadas em uma via ou em um número limitado de vias de diferenciação (committed stem cells), essas células podem ser induzidas em transdiferenciação, como, por exemplo, na obtenção de condroblastos e osteoblastos a partir de células satélites musculares ou de pré-adipócitos.³⁶

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) da medula óssea têm a capacidade de se renovar e se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular.^{38,39} Essas células foram descritas primeiramente por Friedenstein et al.,⁴⁰ que descobriram que as CTMs aderem a placas de cultura, assemelham-se a fibroblastos “*in vitro*” e formam colônias.³⁸⁻⁴¹ Diversos autores têm demonstrado o potencial das CTMs em reconstituir tecido ósseo em modelos experimentais *in vivo*.⁴²⁻⁴⁵ Elas também podem ser cultivadas e diferenciadas *ex vivo*, utilizando meios osteoindutores, para serem reimplantadas com finalidade de reconstituir tecido ósseo.⁴⁶

Além da medula óssea, as CTMs podem ser isoladas de vários outros tecidos, como a polpa dentária⁴⁶⁻⁴⁸ e tecido adiposo⁴⁹⁻⁵³.

A agregação dessas células a uma superfície mineralizada, como cerâmicas porosas, parece favorecer a formação de tecido ósseo primário.⁵⁴⁻⁵⁷ Boo et al.,⁵⁸ em estudo *in vivo*,

utilizaram, em ratos, modelo experimental de engenharia tecidual óssea para implante subcutâneo de células-tronco mesenquimais, carregadas em estrutura tridimensional de β -TCP e HA. Através de estudo histológico e análise bioquímica, constataram que, já na primeira semana após a implantação, existem osteoblastos sobre a superfície mineralizada. Nesse estudo, os níveis de fosfatase alcalina, indicadora de atividade osteoblástica alcançaram valores máximos 2 (duas) semanas após o implante, enquanto os níveis de osteocalcina, indicadora de diferenciação óssea, foram crescentes até a oitava semana. Em modelo experimental semelhante, Kim et al.⁵⁹ compararam diferentes materiais: cerâmica de β -TCP e estruturas absorvíveis de colágeno, para servir como carreadores de proteínas morfogenéticas ósseas, as BMPs. Nesse estudo, foi demonstrada a presença de osteoblastos aderidos à superfície da estrutura carreadora na segunda semana após a implantação subcutânea, com ambos os materiais. Entretanto, a quantidade de osso neoformado e a remodelação óssea foram superiores com o carreador de β -TCP.

Diversos estudos sobre biomateriais ressaltam a importância da composição e da microestrutura porosa do material utilizado.^{37,60-63}

A porosidade é um requisito importante do biomaterial, essencial para a integração entre o tecido vivo e o implante. Cerâmicas porosas foram utilizadas por vários autores, apresentando poros variando entre 100 e 500 μm e verificou-se um aumento contínuo da quantidade de tecido ósseo formado no interior dos poros, sem, no entanto ser observada a fragmentação das partículas de cerâmica.^{61,62} Alguns autores referem que, para uma ótima resposta de regeneração óssea, postula-se que o poro tenha o tamanho mínimo entre 200 e 400 μm , induzindo suficiente vascularização, osteocondução e formação de tecido mineralizado dentro do *scaffold*. Ainda ressaltam que, apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do biomaterial, a presença de poros com dimensões adequadas favorecem o crescimento tecidual através deles, permitindo um entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, desta forma, a resistência do material *in vivo*.⁶³

Em 2011, Liu et al.⁴⁴ realizaram um estudo avaliando o reparo ósseo alveolar em coelhos, utilizando rhBMP-2, CTMs derivadas da polpa dentária (DPSCs) carregadas por um biomaterial - nHAC/PLA (material composto por hidroxiapatita, colágeno e poli (ácido láctico)), sendo o grupo controle portador de osso autógeno da região ilíaca. Os resultados indicaram que nHAC/PLA associado às DPSCs e às rhBMP-2, parece promover melhores resultados que enxertos autógenos nas reconstruções de defeitos ósseos periodontais.

Wilson,⁴⁹ em 2012, realizaram um estudo que investigou o efeito das CTAD, injetadas local ou sistemicamente, no reparo ósseo em mandíbula de porcos. Os autores concluíram que

a presença, local ou sistêmica de CTAD, acelera o processo de reparo ósseo.

Em 2012, Khojasteh et al.⁶⁴ realizaram uma ampla revisão de literatura, utilizando PubMed como base de dados. Os critérios de inclusão de estudos referiram-se a reconstrução óssea de defeitos ósseos utilizando CTMs, em modelos animais e humanos. Os autores verificaram existir uma diferença significativa entre as metodologias e análises empregadas, no que se refere ao tamanho e local das cavidades, na fonte da CTM empregada, na utilização de parâmetros de medição variados e de diferentes fatores de crescimento, concluindo não existir modelo preditivo nas reconstruções que utilizam CTMs. Eles ponderam a necessidade de estudos com desenho metodológico e de análise mais homogêneos.

A revisão de literatura realizada por Khojasteh et al.⁶⁴ revelou que os marcadores mais utilizados para aferir o potencial osteogênico das CTMs são: atividade de fosfatase alcalina,⁶⁵⁻⁶⁶ osteocalcina,⁶⁶⁻⁶⁷ osteopontina,⁶⁸ deposição de cálcio,⁶⁹⁻⁷⁰ expressão de genes osteogênicos,^{65-67,71-73} e coloração vermelha de alizarina⁷². Os "scaffolds" mais utilizados foram: esponja de gelatina absorvível,⁷⁴ cimentos de fosfato de cálcio,⁷⁵⁻⁸⁴ cola de fibrina,^{78,85} o osso heterógeno,^{75,81} gel de alginato,⁵⁶ tela de titânio,⁸⁶ hidrogel,⁸⁷ ácido polilático,⁵⁰ polietilenoglicol^{50,88}. Dentre os modelos animais citados estão o rato, o coelho e o cão, sendo o rato o mais utilizado. Neste último, os defeitos foram realizados em calvária ou fêmur dos animais.^{49,50,52,74,75,86,87}

Como visto, as CTMs têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de grande interesse para serem usadas na terapia do reparo de tecidos lesados^{37,89} e as CTADs têm sido as células de eleição para estes estudos. Essas observações estabelecem uma perspectiva para tratamentos regenerativos, cujos limites têm se mostrado cada vez mais amplos.

3 PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

Propõe-se avaliar o processo de reparo ósseo em modelo de cavidade crítica em fêmur de rato, baseado na aplicação de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTAD), associada a biomateriais (cimento de alfa fosfato tricálcico – α -CFtC, e esponja de gelatina absorvível – EGA).

Dessa forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) realizar uma análise histológica descritiva do reparo ósseo, em fêmur de rato, através do uso ou não de CTAD, associadas aos biomateriais (α -CFtC e EGA);
- b) comparar o processo de reparo ósseo entre os Grupos Testes (com células-tronco) e Controles (sem células), verificando a influência das CTAD associadas a biomateriais, qualitativamente, através de análise visual por escores de exames por imagem (Radiografia e TCFC), e quantitativamente, através de histomorfometria.

4 METODOLOGIA

4.1 PARADIGMA

Este trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, quantitativo.

4.2 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental, controlado. A amostragem foi selecionada de forma aleatória ou probabilística simples - randomizada.

4.3 LOCAL

O experimento foi realizado na Unidade Experimental Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA/UFRGS. O material inorgânico foi confeccionado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, RS, Brasil. As células foram cultivadas no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil.

4.4 HIPÓTESE

A utilização de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CDTA) associadas a α -CFtC e EGA aceleram o processo de reparo ósseo.

4.5 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

Um dos biomateriais utilizado é composto de cimento de fosfato de cálcio baseada no α -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) com modificações introduzidas na composição do cimento²⁸ (α -CFtC) para permitir a incorporação de poros na estrutura, através da adição de surfactante lauril sulfato de sódio e, assim, permitir o crescimento de tecido ósseo para o interior do material. Esta alteração permitiu, além da incorporação de poros, a sua injetabilidade e retirada da amostra dos tubos de polietileno, após secagem a 50°C. Foram preparados 32

blocos pré-curados de cimento de fosfato de cálcio, medindo 3mm de diâmetro e 5mm de altura. As peças de coloração branco-gesso caracterizam a coloração do cimento de fosfato de cálcio (Figura 1). O material foi acondicionado em embalagens de polietileno e essas esterilizadas em peróxido de hidrogênio⁹⁰ segundo protocolo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.⁹¹

O outro biomaterial utilizado foi a esponja de gelatina absorvível,⁷⁴ da marca Cutanplast,¹ de superfície porosa, estéril e de efeito hemostático.

4.6 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra deste estudo foi de 32 ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR (spontaneously hypertensive rats), isogênicos, machos, com cinco meses de idade e peso médio de 304g, selecionados de forma randomizada. Este estudo foi baseado em Puricelli et al.⁹ Foram sorteados oito ratos para cada tempo experimental, conferindo, desta forma, a aleatoriedade de cada uma das amostras. Foram então subdivididos em: Grupo I, mortos com sete dias, Grupo II, com 14 dias, Grupo III, com 30 dias, Grupo IV, com 60 dias de pós-operatório (Tabela 1). Todos os grupos foram submetidos à mesma intervenção cirúrgica no fêmur direito.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos nas dependências da Unidade de Experimentação Animal (UEA), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), em temperatura ambiente de 23° C (mais ou menos um grau); alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Os animais permaneceram sob os cuidados de médica veterinária responsável na UEA.

Tabela 1 – Demonstração da divisão dos animais por tempo e grupos

Tempo (em dias)	n. Total Animais	n. Teste	n. Controle
Sete	8	4	4
14	8	4	4
30	8	4	4
60	8	4	4
Total	32	16	16

Fonte: Autora.

Os animais foram numerados de 1-16 para cada grupo Teste ou Controle (T1 a T16 e C1 a C16).

¹ Cutanplast, Mascia Brunelli Spa, Milão, Itália.

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Aos cinco meses (150 dias) de vida, com um peso médio de 304g, os ratos foram submetidos à cirurgia, segundo protocolo que se segue:

Assepsia

Durante todos os procedimentos cirúrgicos, foram mantidos os critérios de assepsia. O profissional estava paramentado com avental cirúrgico, luvas cirúrgicas estéreis, propés, máscara, gorro e óculos de proteção. O instrumental cirúrgico utilizado foi individualizado em conjuntos e esterilizado em autoclave, segundo protocolo do HCPA.⁹¹

Anestesia

Para a anestesia do animal, após a apreensão do mesmo pelo dorso, foi aplicada uma injeção intramuscular do anestésico na região interna do membro posterior esquerdo. Para tal, usou-se uma solução de Cloridrato de Xylazinaⁱ e Cloridrato de Cetamina a 10%,ⁱⁱ respectivamente, na dosagem de 0,5ml/kg e 1,0 ml/kg de peso corporal do rato.⁹²

Tricotomia, Antissepsia e Infiltração anestésica local

O animal foi colocado em decúbito lateral esquerdo e o membro inferior direito foi então tricotomizado (Figura 2A) com aparelho elétrico na sua parte externa e preparado para a cirurgia com iodoform aquoso a 2%.

Como anestesia infiltrativa local, foi utilizada a solução de cloridrato de bupivacaína 0,5%ⁱⁱⁱ e adrenalina em concentração de 1:200.000, sendo diluído 0,3ml de anestésico para 0,7ml de água para injeção (Figura 2A).

Incisão

Uma incisão na pele, de aproximadamente 3cm, foi realizada com bisturi Bard Parker nº 3, montado com uma lâmina de aço nº 15, na área externa do membro posterior direito (Figura 2B).

ⁱ Anasedan, Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, SP.

ⁱⁱ Ketamina Anger (Ketamina 10%), União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP.

ⁱⁱⁱ Astra México S.A., Naucalpan, México.

Divulsão, descolamento e afastamento dos tecidos

Com o auxílio de tesoura romba, procedeu-se a divulsão dos tecidos por planos musculares. A seguir, realizou-se a incisão do periósteo com bisturi e o descolamento do mesmo com sindesmótomo delicado, acessando assim a superfície cortical do fêmur (Figura 3A). O afastamento tecidual, realizado pelo auxiliar, permitiu a visibilidade no campo cirúrgico.

Ostectomia

As cavidades cirúrgicas tiveram dimensões de 3,1mm de diâmetro (Figura 6) e 3,5mm de profundidade na diáfise óssea. Como instrumental cirúrgico especial, foram utilizadas brocas trefinaⁱ, de 3,1mm de diâmetro externo e 2,5mm de diâmetro interno (Anexo A) e seu corte foi ativado com motor elétrico em baixa rotação, mantendo-se irrigação e aspiração contínuas (Figura 3B).

As cavidades foram designadas de: Teste 1 (T1) ou Controle 1 (C1), localizado na porção proximal ou superior do fêmur; e Teste 2 (T2) ou Controle 2 (C2), localizado na porção central do fêmur. Os fragmentos ósseos retirados da trefina com sonda exploradora foram desprezados.

Cultivo celular

Foram utilizadas células do tecido adiposo de ratos albinos machos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR, isogênicos – mesma linhagem dos animais receptores das células-tronco. As etapas de obtenção das células, separação e cultura das células *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil. O isolamento das CTAD foi realizado conforme metodologia já estabelecida por Nardi e Camassola,⁹³ baseada no protocolo descrito por Zuk et al.⁹⁴ O tecido adiposo foi lavado com solução salina estéril para remover os restos celulares e hemácias. A fração estromal foi isolada por digestão com colagenase tipo I (Sigmaⁱⁱ) na concentração de 1mg/g de tecido adiposo por 30-40 minutos, a 37°C e com agitações periódicas. Após neutralização da colagenase com meio Dulbecco's modified Eagle's contendo HEPES (HDMEM) e 10% de plasma autólogo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1.800 rpm. Após nova centrifugação, as células compoem a fração estromal do

ⁱ PROMM® Indústria de Materiais Cirúrgicos Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil.

ⁱⁱ Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA.

tecido adiposo foram ressuspensas em HDMEM e utilizadas para o estabelecimento de cultivo de CTAD. Para cultivo, as células foram ressuspensas em HDMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em cultura, conforme metodologia estabelecida anteriormente por Meirelles e Nardi.³⁷ A morfologia das culturas foi analisada por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25ⁱ). A cinética do cultivo foi acompanhada por contagem das células plaqueadas e recuperadas em cada passagem.

Em cada peça de biomaterial, foram adicionados 15µl de meio de cultura contendo 3×10^5 células. O biomaterial foi incubado a 37°C por 2 horas, sendo então lavado com meio de cultura fresco e utilizado para tratamento da lesão. Para as cavidades que receberam a EGA, a densidade celular foi a mesma, porém o volume foi de 50µl.

Implantação

No leito ostectomizado T1, foi implantado e condensado o bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), pré-incubados com células-troncos mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAD), e em T2, fragmento de EGA associado, no transcirúrgico, às células-tronco (CTAD) (Figura 4). No leito C1, foi implantado e condensado o cimento de fosfato de cálcio, na forma de bloco pré-curado (Figura 5). O leito C2 recebeu um fragmento de EGA (Cutanplast) (Figura 5). Os leitos C1 e C2 não receberam as células.

Houve a necessidade de condensação/compressão de 1,5mm do bloco de α -CFtC na cavidade cirúrgica, com instrumento de ponta romba, já que os mesmos tinham 5mm de altura e as cavidades cirúrgicas 3,5mm de profundidade.

Síntese

Os cuidados com a ferida operatória envolveram a lavagem abundante da área com soro fisiológico.

A sutura do tecido por planos foi realizada, a pontos isolados, com fio absorvível 4-0 do tipo poliglactina.ⁱⁱ A pele foi suturada com fio não-absorvível 5-0, do tipo nylon monofilamentado.ⁱⁱⁱ

ⁱ Carl Zeiss, Alemanha.

ⁱⁱ Vicryl - Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

ⁱⁱⁱ Mononylon - Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Analgesia

Para analgesia, foi administrado, nas primeiras 8 horas, por via subcutânea, cloridrato de tramadol¹, com dose proporcional ao peso do animal, sendo 1,0 ml/kg.

Coleta e armazenamento das peças

Após a morte dos ratos, foi realizado o controle e observação clínica da região operada, para confirmar a ausência de alteração tecidual envolvendo infecções, fraturas.

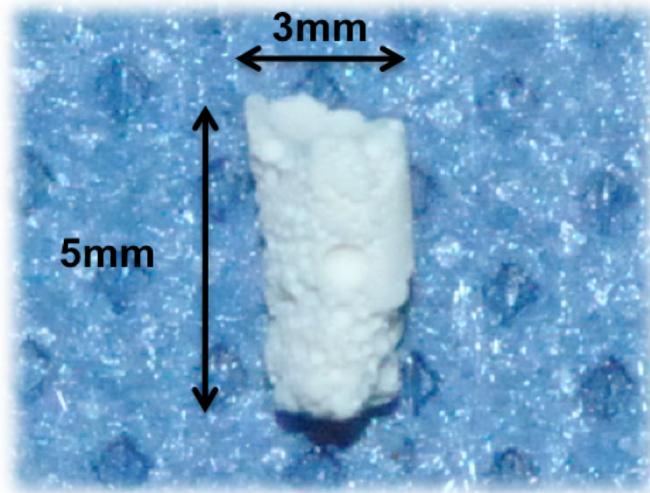
Para a coleta das amostras, os animais correspondentes a cada grupo foram mortos seguindo o cronograma de sete, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios. O êxito letal foi obtido com base na Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA - Resolução Normativa 04/97 (Anexos B e C). Imediatamente após a eutanásia foi realizada a necropsia com a remoção dos fêmures dos animais.

As peças operatórias foram colocadas imediatamente em recipientes plásticos devidamente identificados, fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada a 10%, com a finalidade de evitar as alterações *post mortem*. Os animais foram numerados de 1-16 para cada grupo Teste ou Controle (T1 a T16 e C1 a C16).

Após um período médio de sete dias de fixação em formol, as peças operatórias foram sequencialmente radiografadas e escaneadas.

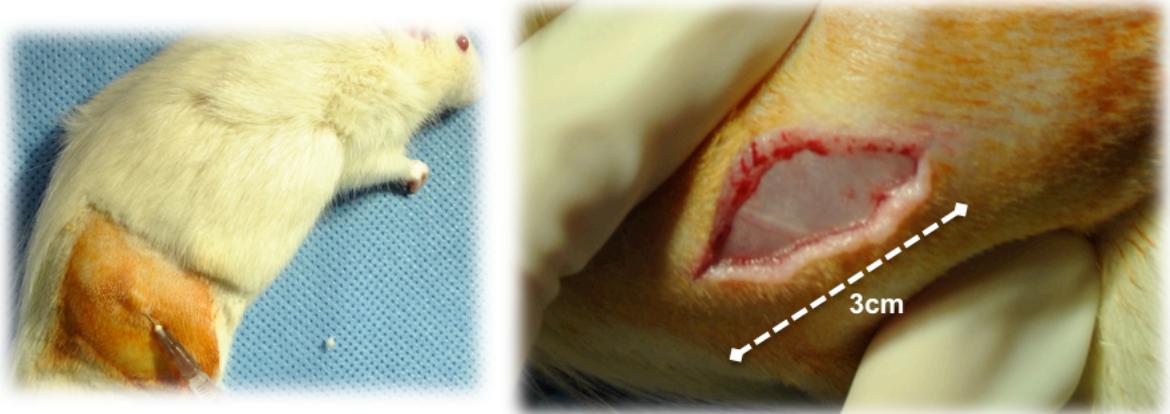
¹ Cloridrato de Tramadol, Carlo Erba S.A., Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil.

Figura 1 – Dimensões do bloco de cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico (α -CFtC), para implantação em cavidades ósseas cirurgicamente criadas. Observe-se a estrutura porosa do material



Fonte: Autora.

Figura 2 – (A) Tricotomia, Antissepsia com iodoform aquoso e anestesia local; (B) incisão em pele

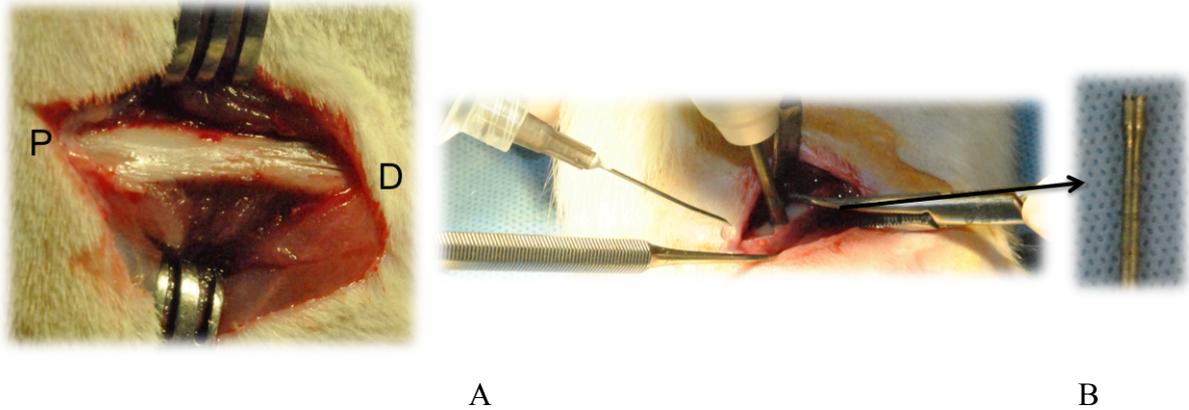


A

B

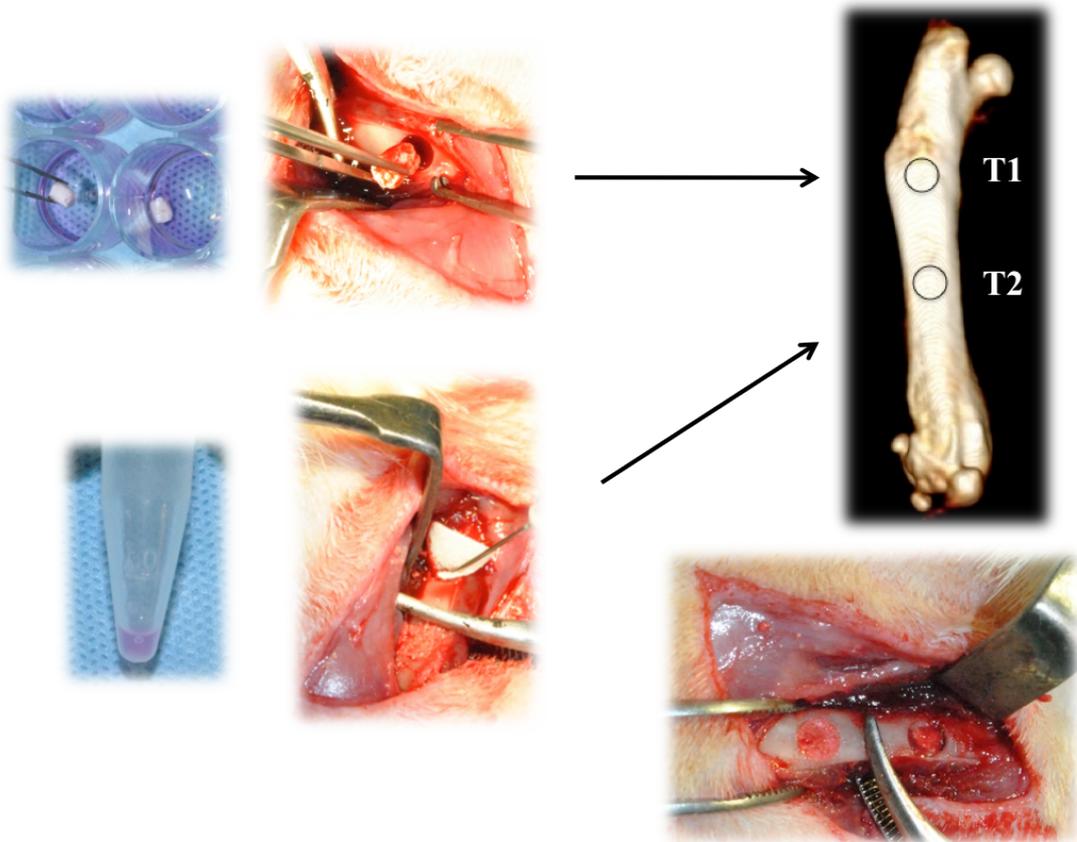
Fonte: Autora.

Figura 3 – (A) Acesso a diáfise do fêmur direito; porção proximal (P) e porção distal (D); (B) osteotomia sob irrigação contínua; broca trefina (à direita)



Fonte: Autora.

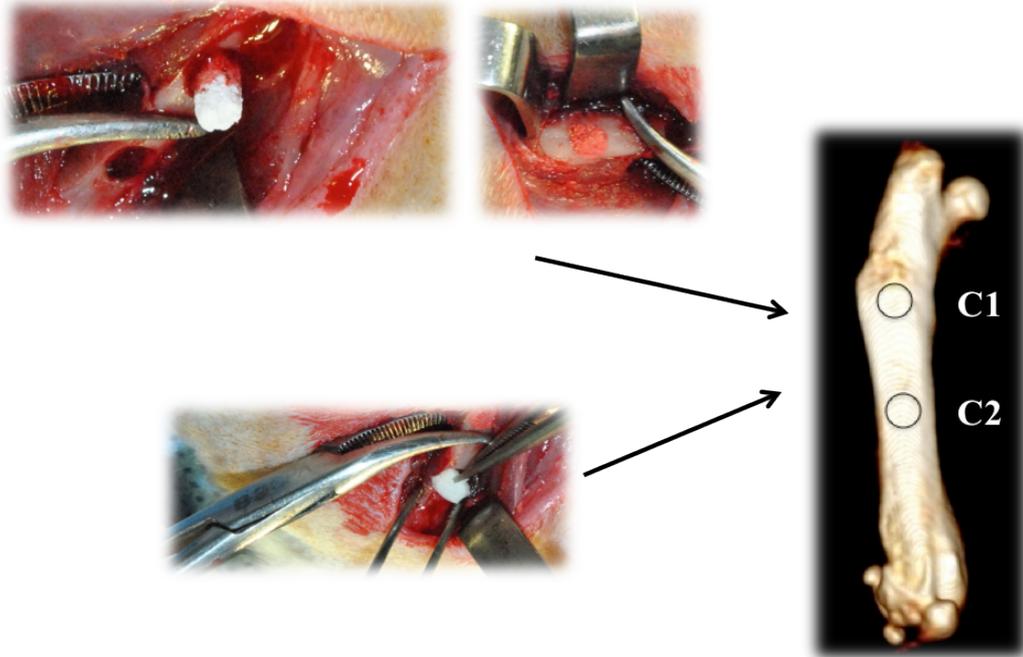
Figura 4 – Transoperatório dos Grupos Testes



Fonte: Autora.

Legenda: **Testes** – Implantação, na região proximal do fêmur de rato, de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), na forma de bloco pré-curado, associado às células-tronco (foto superior – Cavidade T1). Implantação, na região central do fêmur de rato, de EGA, associada às células-tronco (foto inferior – Cavidade T2).

Figura 5 – Transoperatório dos Grupos Controles



Fonte: Autora.

Legenda: Controles – Implantação, na região proximal do fêmur de rato, de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), na forma de bloco pré-curado, sem células-tronco (foto superior – Cavidade C1). Implantação, na região central do fêmur de rato, da EGA, sem células-tronco (foto inferior – Cavidade C2).

Figura 6 – Imagem de TCFC dos fêmures do presente estudo



Fonte: Autora.

Legenda: Dimensões fêmur (TC feixe cônico): 35mm (comprimento); 4,5mm (espessura proximal); 4,1mm (espessura central); 3,0mm (espessura distal). Raio da cavidade cirúrgica central: 3,1mm.

4.8 EXAMES POR IMAGEM

4.8.1 Estudo radiográfico

Os fêmures foram radiografados pela autora no Laboratório de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, utilizando-se um aparelho de Raio X Spectro 70x,ⁱ com um regime elétrico de 70kV e 8mA, em filmes dentais Kodak Ultra-speed,ⁱⁱ velocidade D.

Os fêmures foram posicionados diagonalmente ao longo eixo do filme, com sua porção anatômica proximal em direção ao marcador do mesmo. Cada peça óssea foi radiografada em seus ângulos, perfil e póstero-anterior. Todos os filmes foram fixados sobre uma folha de papel sobreposta a uma superfície plana. Esse procedimento impediu o deslocamento do filme, visto haver uma moldura delimitante previamente desenhada ao papel. A distância foco-filme foi padronizada em 4cm e o aparelho posicionado perpendicularmente ao filme. A cada cinco radiografias realizadas, a distância foco-filme era novamente mensurada. O tempo de exposição para melhor imagem foi determinado em 0,3s. Previamente, foram testados os tempos de 0,2s, 0,3s, 0,4s, 0,5s e 0,6s, dos quais escolheu-se o que produziu melhor contraste.

Assim, totalizaram-se 64 radiografias, sendo duas de cada fêmur (32 unidades). Estas foram então processadas automaticamente.ⁱⁱⁱ

As radiografias dos fêmures de todos os Grupos Controles e Testes foram então analisadas pela autora e professora orientadora, visando identificar alterações estruturais quanto à integridade óssea e à estabilidade do implante.

Foi avaliado o reparo ósseo, comparativamente entre os tempos experimentais e os grupos Testes e Controles, através da análise visual de dois pesquisadores cegos. As imagens foram cegadas pela autora e o procedimento de medição foi realizado por dois examinadores calibrados.

ⁱ Dabi Atlante S.A. Indústria Médico Odontológica, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

ⁱⁱ Kodak Ultra-speed – Carestream Health Inc, Rochester, New York, USA.

ⁱⁱⁱ Processadora automática 9000[®], DENT-X, Nova York, USA.

4.8.2 Estudo tomográfico

Os fêmures foram escaneados pelo Serviço de Imagem Tomocenter Moinhos de Ventoⁱ, por especialista em radiologia.

O aparelho utilizado foi de Tomografia Computadorizada volumétrica de feixe cônico i-CAT Gendex, CB500.ⁱⁱ

As imagens foram adquiridas com voxel de 0,2 ou 0,125 de resolução e reconstruídas em três planos, utilizando o software Xoranⁱⁱⁱ e OsiriX^{iv}.

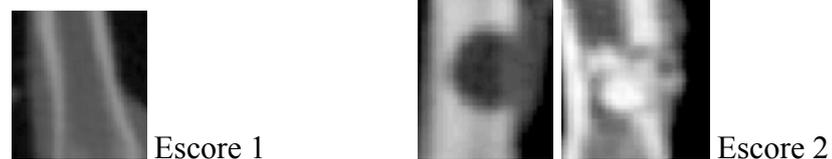
Foi realizado um estudo nos fêmures para avaliar as dimensões (comprimento e espessura), sendo confirmadas no exame tomográfico, conforme Figura 6.

Comparando os tempos experimentais e os grupos Testes e Controles, fez-se a avaliação do reparo ósseo. As imagens foram cegadas pela autora e o procedimento de medição foi realizado por dois examinadores calibrados e cegos.

4.8.3 Análise por escores

Para análise da área de neoformação do tecido ósseo, utilizou-se o método de avaliação por escores. A autora realizou o treinamento dos examinadores, cirurgiões-dentistas, a partir da visualização de imagens compatíveis com cada escore. Tanto nas imagens radiográficas como tomográficas, os escores atribuídos eram 1 ou 2, onde 1 equivalia à densidade óssea próxima ou igual ao padrão de normalidade e 2, área de densidade diferente ao padrão ósseo. Durante o processo, imagens compatíveis com os escores permaneciam disponíveis para consulta dos avaliadores (Figura 7).

Figura 7 – Padrão utilizado para análise visual por escores, de TCFC, dos fêmures do presente estudo



Fonte: Autora.

Legenda: Escore 1: padrão de normalidade óssea; Escore 2: diferente densidade óssea.

ⁱ Tomocenter Moinhos de Vento, Rua Mostardeiro, nº 157, sala 502, Porto Alegre, RS, Brasil.

ⁱⁱ Gendex Dental Systems, North Penn Road, Hatfield, PA, USA.

ⁱⁱⁱ Xoran Technologies Inc., South State Road, Ann Arbor, Michigan, USA.

^{iv} Pixmeo, Rue de Bernex, Bernex, Switzerland.

4.9 ESTUDO HISTOLÓGICO

O preparo das peças foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS). O material em estudo foi descalcificado em solução de ácido nítrico a 5% (10ml) durante 5 dias e desidratados, em concentrações sucessivas de álcool (de 80% até 100%).

Na seqüência, os fêmures foram cortados macroscopicamente, longitudinalmente e exatamente no seu centro. O material recebeu processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Procedeu-se, então, os cortes em micrótomoⁱ, no sentido longitudinal do longo eixo do fêmur, com espessura de 4µm, sendo utilizados para análise o corte central e dois laterais. Os preparos histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

A leitura e interpretação das mesmas foram realizadas utilizando-se um microscópio ópticoⁱⁱ em progressivos aumentos de 40, 100, 250 e 400 vezes.

4.9.1 Histomorfometria

Foi avaliado o reparo ósseo através de análise histomorfométrica, comparativamente entre os grupos estudados, determinando-se as alterações teciduais ocorridas. As lâminas foram cegadas pela autora e o procedimento de medição foi realizado por dois avaliadores, cegos e calibrados.

A análise histomorfométrica foi realizada através de uma câmara de vídeoⁱⁱⁱ acoplada a um microscópio binocular^{iv} e a um computador,^v utilizando o software Qcapture.^{vi} Foram avaliadas a quantidade de tecido ósseo neoformado e a distância entre as corticais remanescentes.

Para aferição da quantidade de tecido ósseo neoformado foi utilizado o programa Adobe Photoshop cs3,^{vii} por meio da ferramenta *magic tool*, no aumento de 100x. A partir da superfície externa da cortical (superior) foi traçada e projetada uma reta em continuidade com a mesma e determinado o limite superior da área a ser medida em relação de 20° com esta

ⁱ Micrótomo Leica 2155.

ⁱⁱ Model Lambda LQT 2, ATTO Instruments Co., Hong Kong, China.

ⁱⁱⁱ Olympus, Qcolor 5, Coolet, RTV.

^{iv} Olympus Optical Co., CX41RF.

^v Dell, Dimension 5150.

^{vi} University of Texas, San Antonio, USA.

^{vii} Adobe Photoshop - Versão 10.1.

reta. Este traço, sempre com o mesmo comprimento, formava o lado menor do retângulo. As demais linhas limitantes foram determinadas em ângulo reto com este, formando o retângulo da leitura. Os lados menores e maiores do retângulo mediram 800 e 1200 pixel respectivamente. Estas medidas foram determinadas para manter uma padronização e por ser a área de maior neoformação óssea observada no estudo descritivo. Selecionou-se apenas a área de tecido ósseo neoformado, excluindo-se os espaços intertrabeculares e vasculares, bem como a cortical remanescente, gerando valores em pixel que foram convertidos para um valor percentual (Figura 8).

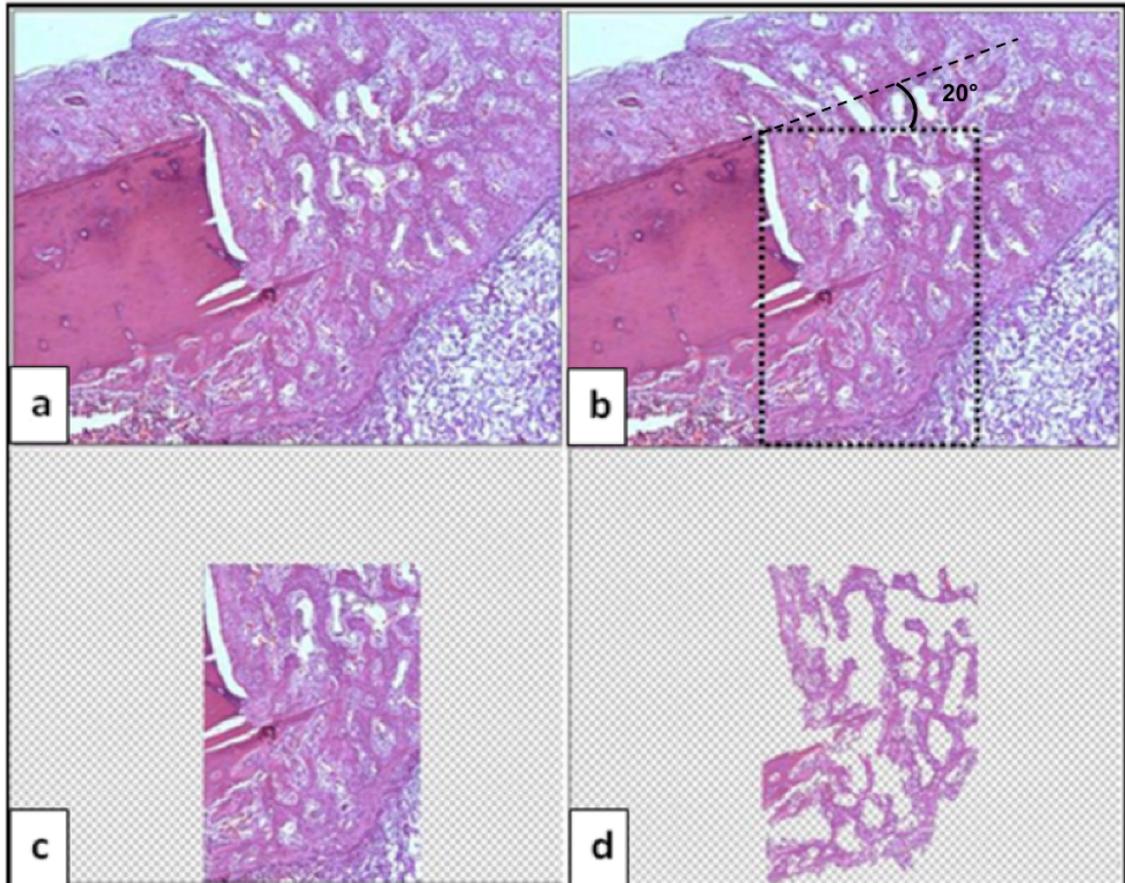
Para análise de mensuração de defeito ósseo (análise linear), utilizou-se a ferramenta *distance* do programa *ImageTool*,¹ no aumento de 40x. Traçou-se uma linha na abertura da cavidade com intuito de medir o defeito ósseo remanescente, gerando um valor em pixel. Quando o defeito apresentava-se completamente fechado, foi atribuído o valor 0. A análise estatística compreendeu apenas os dados das cavidades abertas. As cavidades fechadas foram categorizadas e mostradas em valor absoluto.

As análises histomorfométricas foram realizadas por dois examinadores cegos e calibrados. Para a confirmação da calibração intra e inter examinador, aplicou-se o teste T para amostras pareadas, associado ao gráfico de Bland-Altman.

O escore da análise visual radiográfica e tomográfica variou de 0 a 2 e foi aplicado por dois examinadores igualmente cegos e calibrados, considerando o valor Kappa acima de 0,8 excelente. Em caso de discordância entre os avaliadores na atribuição dos escores, a opinião de um terceiro examinador, igualmente cirurgião-dentista, foi utilizada para desempate.

¹ Versão 2.81; Quantitative Imaging Corporatio, Inc.; 2005.

Figura 8 – Lâmina histológica corada com HE do Grupos Testes - Sete dias



Fonte: Autora.

Legenda: cavidade T2 (objetiva de 100X): (a) imagem do limite do defeito com a cortical; (b) delimitação da área padrão retangular a ser avaliada (1000x1400px²); (c) área adjacente a cortical óssea correspondente ao osso neoformado; (d) eliminação das áreas não correspondentes ao tecido ósseo.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística da histomorfometria foi realizada através do programa *SPSS for Windows versão 19.0*. A comparação entre os grupos Testes e Controles, nos diferentes tempos experimentais, foram descritas através da média e desvio padrão. Na análise por imagem, para associar variáveis categóricas entre si, foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Em caso de tabelas 2x2, foi utilizado o teste de Qui-quadrado com correção de Yates. Foi considerado um nível de significância estatística de 5%.

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto segue as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Resolução Normativa 04/97, da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. O referido projeto de pesquisa, número 110159, foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo D), sendo aprovado em 25/08/11.

5 RESULTADOS

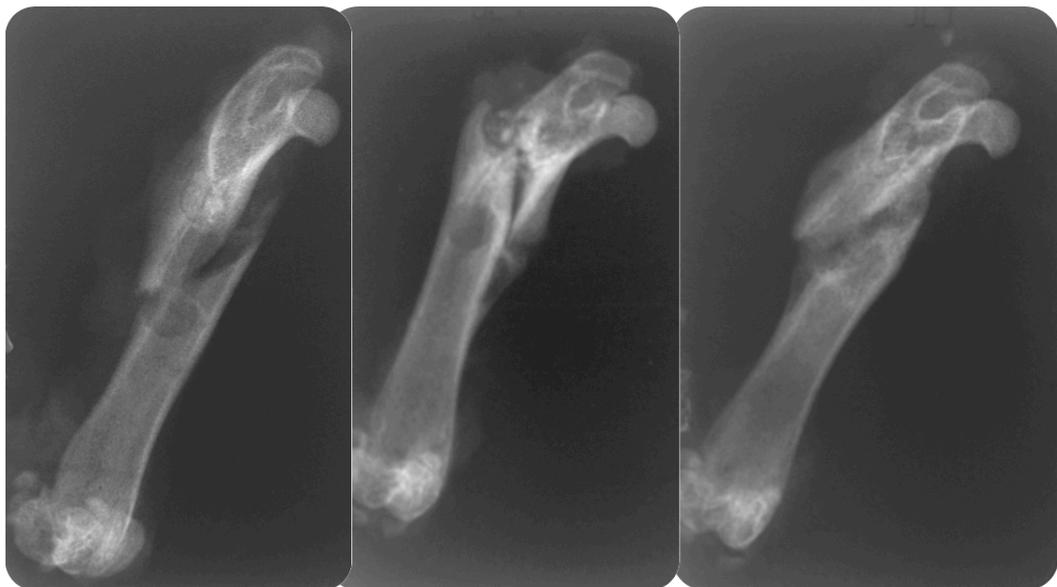
5.1 RESULTADO EXAMES POR IMAGEM

5.1.1 Estudo radiográfico

O estudo radiográfico objetivou a identificação das áreas para método histológico e as possíveis fraturas ocorridas. Os exames radiográficos compreenderam os períodos experimentais de sete, 14, 30 e 60 dias. Estão aqui contemplados apenas os achados radiográficos relevantes para os objetivos do presente trabalho:

- a) houve solução de continuidade, caracterizando fratura, em três fêmures (Figura 9): C13 (controle 14 dias), T11 (teste 30 dias) e C16 (controle 60 dias). Estas amostras foram excluídas de todas as análises;
- b) as imagens apresentadas (Figuras 10 e 11) permitem visualizar a evolução radiográfica do reparo ósseo, após o procedimento metodologicamente proposto, de sete e 60 dias, em duas tomadas radiográficas (perfil e pósterio-anterior, respectivamente).

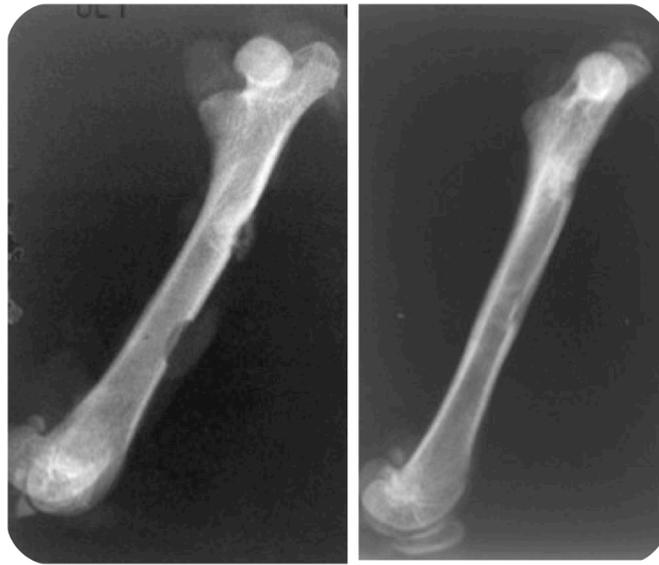
Figura 9 – Fratura dos fêmures com 14, 30 e 60 dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Radiografias pósterio-anteriores das amostras C13, T11 e C16.

Figura 10 – Radiografias perfil dos fêmures com sete e 60 dias pós-operatórios, das amostras C4 e C15



Fonte: Autora.

Figura 11 – Radiografias póstero-anteriores dos fêmures sete e 60 dias pós-operatórios, das amostras T15 e T5



Fonte: Autora.

5.1.2 Análise visual por escores

Dentro de cada tempo experimental, havia duas áreas de análise: cavidade cirúrgica proximal e cavidade cirúrgica central, conforme metodologia descrita.

Os resultados da análise visual por escore revelaram que os examinadores estavam calibrados, obtendo um índice de reprodutibilidade Kappa inter-examinador de 0,96 para análise da TCFC e de 0,98 para a imagem radiográfica para um $p < 0,0001$.

O escore 2, sendo valores diferentes da densidade óssea padrão, foi considerado não satisfatório, e o escore 1, atribuído para valor aproximado ou igual à densidade óssea, considerado satisfatório.

Sendo assim, os resultados da análise visual por escores na TCFC mostraram diferença significativa. A densidade mais próxima ou igual ao tecido ósseo foi maior no Grupos Testes, com 76,7% das cavidades apresentando escore 1 (Figura 12). No Grupos Controles, 42,9% apresentaram escore 1 ($p=0,018$ - Tabela 2).

As TCFC foram reconstruídas em 3D para análise visual das áreas (Figura 13).

Os resultados da análise visual por escores na imagem radiográfica não revelou diferença significativa entre os grupos Testes e Controles (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise visual dos exames de imagem, por escore

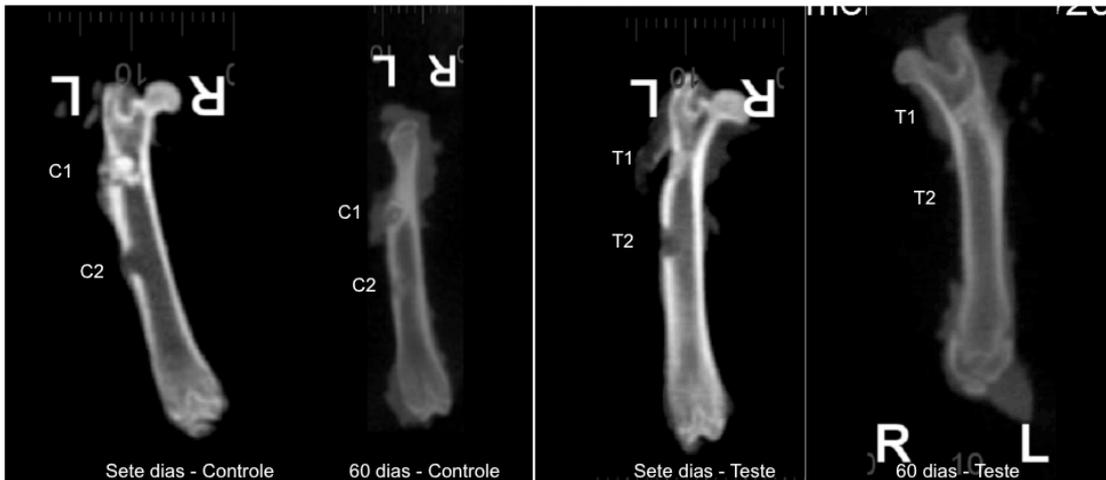
	T	C	<i>p</i>
Tomografia de feixe cônico	23 (76,7%)	12 (42,9%)	<i>0,018</i>
Radiografia	23 (76,7%)	17 (60,7%)	<i>0,304</i>

Fonte: Autora.

Legenda: Teste de Qui-quadrado com correção de Yates revelando o percentual de ocorrência do escore 1 no grupos Testes e Controles.

Os resultados revelam significância um $p < 0,05$, conforme grifado em vermelho, em TCFC $p=0,018$.

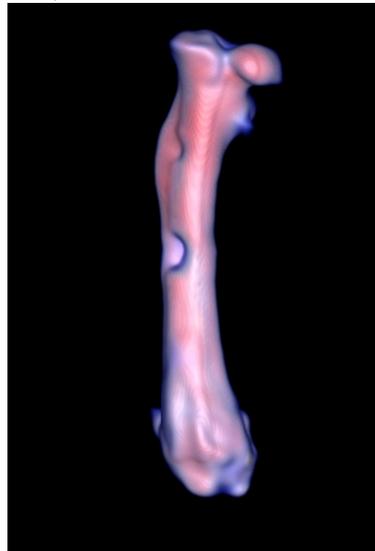
Figura 12 – TCFC em cortes sagitais, de sete e 60 dias pós-operatórios, dos grupos Controles e Testes



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se, na porção superior dos fêmures aos sete dias, a cavidade preenchida com cimento de fosfato de cálcio (hiperdenso) e na porção central as cavidades preenchidas com EGA (hipodenso). Aos 60 dias, há uma maior homogeneidade na densidade óssea, porém são detectáveis áreas limitantes nos grupos controles, mais visível na cavidade C1. Nos grupos testes a homogeneidade da cortical e esponjosa ósseas confundem a anterior presença das cavidades. Por condições técnicas, as indicações L e R foram fixadas aleatoriamente no filme.

Figura 13 – TCFC, estudo em 3D – Fêmur T9, 7 dias



Fonte: Autora.

Legenda: observa-se a cavidade central e cavidade proximal (superior) em visão lateral.

5.2 ESTUDO HISTOLÓGICO DESCRITIVO

Os resultados encontrados na leitura das lâminas estão descritos em ordem crescente dos períodos experimentais: sete, 14, 30 e 60 dias, e os cortes foram sorteados para a descrição, sendo assim aleatórios. Dentro de cada tempo experimental, a descrição foi dividida em Teste: T1 – cavidade proximal (implante do bloco de cimento de α -CFtC, associado às células-tronco) e T2 – cavidade central (preenchimento com EGA, associado às células-tronco); e Controle: C1 – cavidade proximal (implante de bloco de cimento de fosfato de α -CFtC, sem células-tronco) e C2 – cavidade central (preenchimento com EGA, sem células-tronco).

Período de sete dias (Figura 14)

Cavidade cirúrgica T1 (α -CFtC + células)

As secções revelam solução de continuidade marcadamente regular da cortical ostectomizada. Observa-se a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos no interior da cavidade córtico-medular. Há a presença de intenso infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear, hemácias e proliferação fibroblástica. Observa-se ainda tecido ósseo neoformado circundando as porções de cimento de fosfato de cálcio e região central e no assoalho do canal medular e angiogênese (Figura 15).

Cavidade cirúrgica T2 (EGA + células)

As secções revelam as corticais remanescentes da ostectomia. No espaço medular observa-se a presença da esponja de gelatina na região central, infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear e maciça neoformação óssea trabecular, circundando a esponja de gelatina e no teto da cavidade.

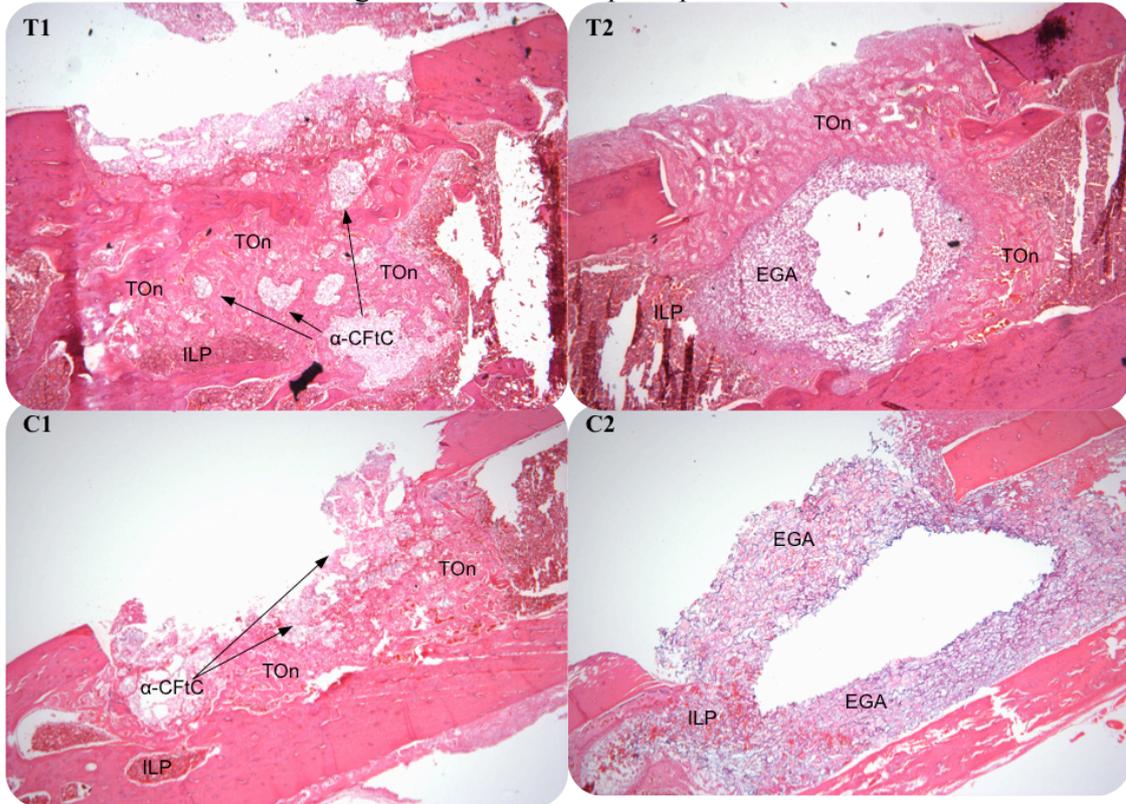
Cavidade cirúrgica C1 (α -CFtC)

Observa-se a solução de continuidade marcadamente regular da cortical ostectomizada e a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos no interior da cavidade córtico-medular. Há a presença de intenso infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear, hemácias e proliferação fibroblástica. Observa-se ainda tecido ósseo neoformado na porção central e no assoalho do canal medular.

Cavidade cirúrgica C2 (EGA)

As secções revelam solução de continuidade marcadamente regular delimitando o teto e o assoalho da cavidade óssea. No espaço medular observa-se a presença da esponja de gelatina na região central entre as corticais, e infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear. Não se observa neoformação óssea.

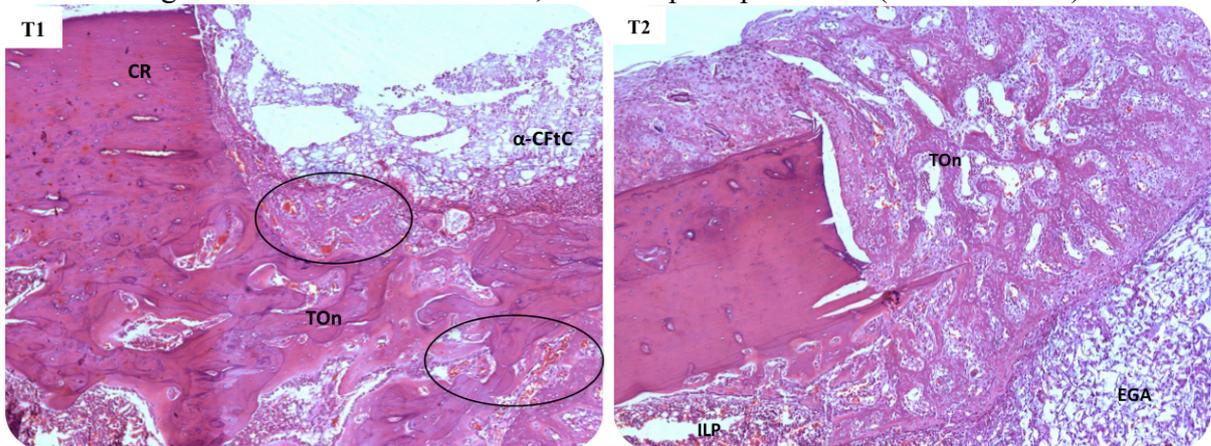
Figura 14 – Sete dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Cavidades T1, T2, C1 e C2 – (aumento 40x) - T1 : Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). T2: Observa-se (região central do fêmur) a esponja de gelatina absorvível (EGA), o tecido ósseo neoformado (TON) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). C1: Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). C2: Observa-se (região central do fêmur) a esponja de gelatina absorvível (EGA) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP).

Figura 15 – Cavidades T1 e T2, sete dias pós-operatórios (aumento 100x)



Fonte: Autora.

Legenda: T1: Observa-se o bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), tecido ósseo neoformado (TOn), a cortical remanescente e a linha de ostectomia e a intensa angiogênese (\circ). T2: observa-se a esponja de gelatina absorvível (EGA), tecido ósseo neoformado (TOn) e infiltrado linfoplasmocitário (ILP).

Período de 14 dias (Figura 16)

Cavidade cirúrgica T1 (α -CFtC + células)

As secções revelam solução de continuidade da cortical ostectomizada com tecido ósseo neoformado interposto. Observa-se a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos e tecido ósseo neoformado abundante circundando o material. Observam-se células gigantes multinucleadas ao redor dos bordos do cimento (setas), reabsorvendo o material (Figura 17). Há tecido ósseo neoformado preenchendo assoalho, região central e teto da cavidade, inclusive na região externa ao defeito, sobre a cortical remanescente.

Cavidade cirúrgica T2 (EGA + células)

As secções revelam as corticais remanescentes da ostectomia. No espaço medular e no teto, observa-se abundante neoformação de tecido ósseo imaturo, constituindo uma estrutura trabecular, ocluindo a ferida. Não se observa a esponja de gelatina absorvível (EGA) em nenhuma secção neste tempo experimental. No assoalho da cavidade observa-se infiltrado inflamatório e hemácias.

Cavidade cirúrgica C1 (α -CFtC)

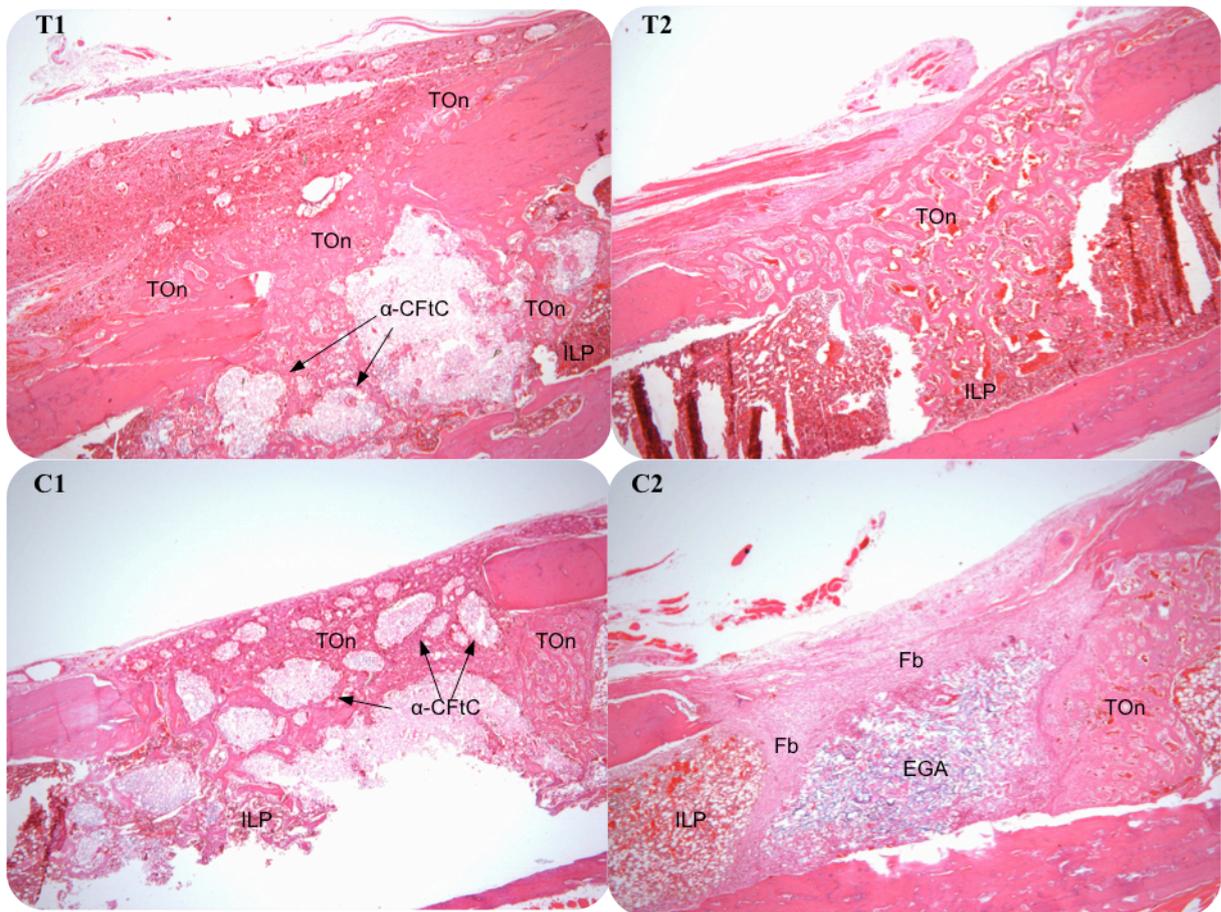
Observa-se a solução de continuidade marcadamente regular da cortical ostectomizada e a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos no interior da cavidade córtico-medular. Há a presença de tecido ósseo imaturo neoformado circundando os fragmentos do material

aloplástico. Há a presença de infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear e hemácias na porção central do canal medular.

Cavidade cirúrgica C2 (EGA)

As secções revelam solução de continuidade marcadamente regular delimitando o teto e o assoalho da cavidade óssea. No espaço medular observa-se a presença da esponja de gelatina na região central, porém o que chama atenção é a intensa fibroplasia (Figura 18), infiltrado inflamatório e hemácias circundando a esponja de gelatina.

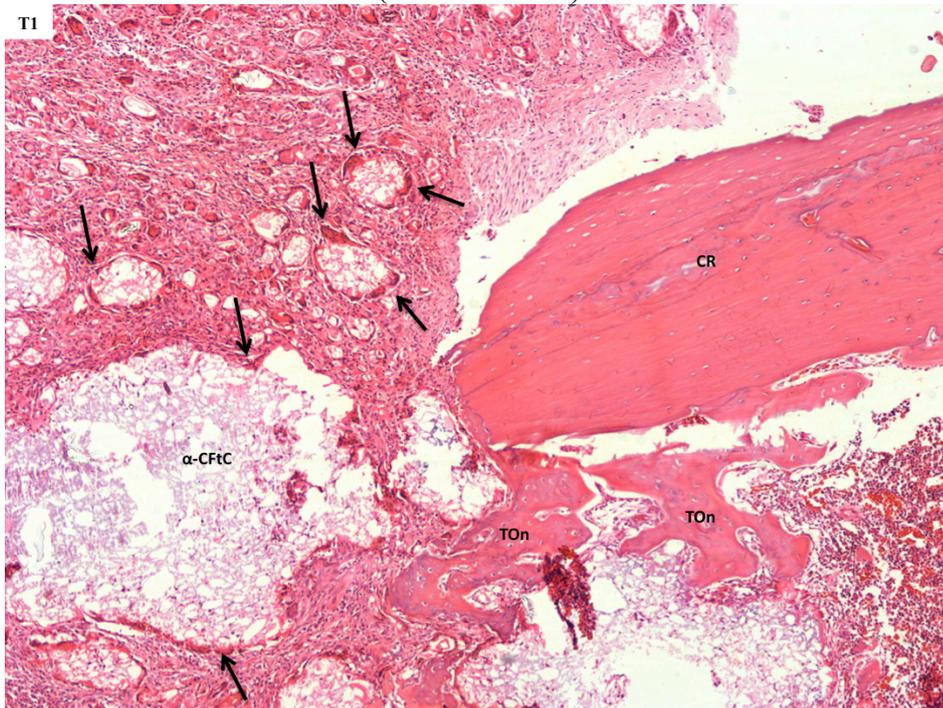
Figura 16 – 14 dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Cavidades T1, T2, C1 e C2 – (aumento 40x) – T1 : Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON), inclusive sobre a cortical óssea remanescente, e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). T2: Observa-se o intenso tecido ósseo neoformado (TON) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). C1: Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP). C2: Observa-se (região central do fêmur) a esponja de gelatina absorvível (EGA) e infiltrado linfoplasmocitário e hemácias (ILP).

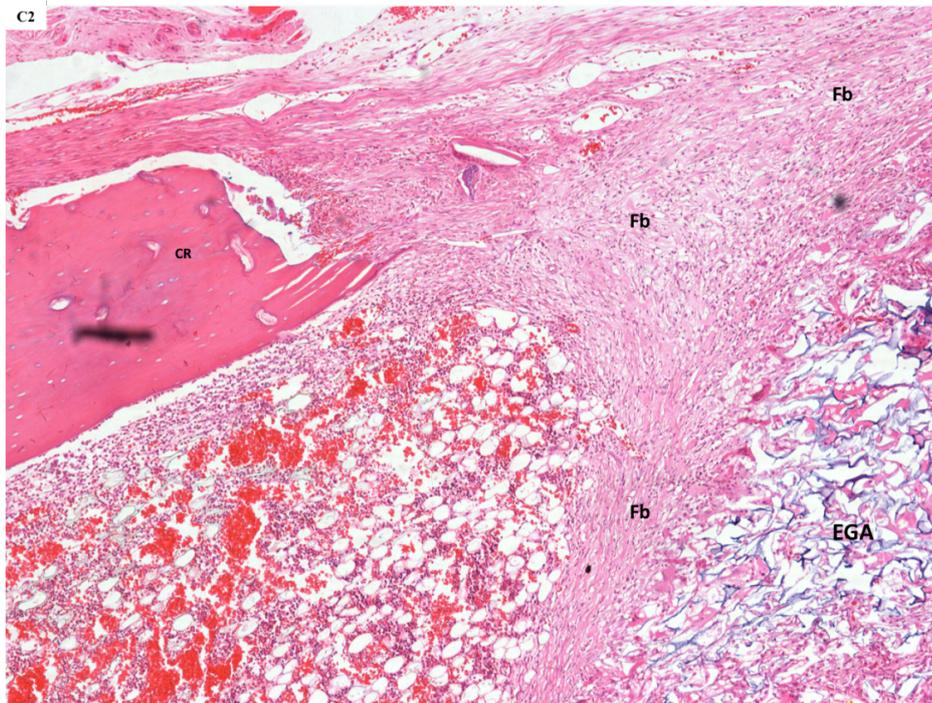
Figura 17 – Cavidade T1 (cimento de fosfato de cálcio + CTAD), 14 dias pós-operatórios (aumento 100x)



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se o bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos e as células gigantes multinucleadas ao redor dos bordos do cimento (setas), reabsorvendo o material. Observa-se ainda tecido ósseo neoformado (TON) e a cortical óssea remanescente (CR).

Figura 18 – Cavidade C2 (EGA sem CTAD), 14 dias pós-operatórios (aumento 100x)



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se a esponja de gelatina absorvível (EGA), a cortical óssea remanescente (CR) e a intensa fibroplasia (Fb).

Período de 30 dias (Figura 19)

Cavidade cirúrgica T1 (α -CFtC + células)

As secções revelam a estabilidade do material aloplástico na cavidade ostectomizada. Em todas secções observa-se neoformação óssea abundante. A intensa neoformação óssea no interior e teto da ferida, sugere progressiva substituição deste por tecido ósseo.

Cavidade cirúrgica T2 (EGA + células)

As secções revelam processo de reparo na cortical óssea do teto da cavidade, apresentando volume ósseo compatível com normalidade na área. No espaço medular, observa-se a intensa neoformação óssea, ocluindo a cortical. Canal medular com células adiposas e dimensões e aspecto celular compatíveis com sinal de normalidade (Figura 20). Observa-se intensa angiogênese. Não se observa a esponja de gelatina absorvível (EGA) em nenhuma secção neste tempo experimental.

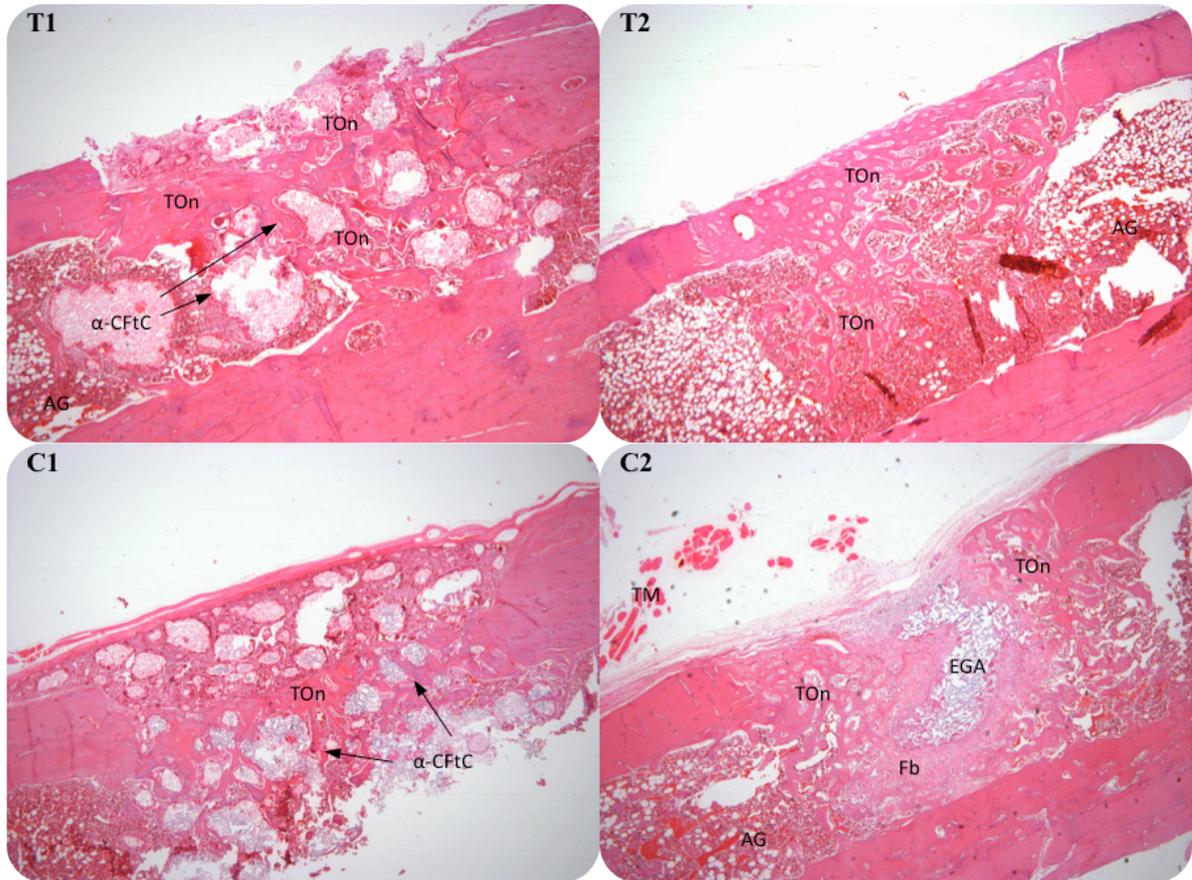
Cavidade cirúrgica C1 (α -CFtC)

Observa-se a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos no interior da cavidade córtico-medular. Em todas secções observa-se neoformação óssea em ilhas. A neoformação óssea apresenta-se desorganizada e localizada no teto da cavidade. Em alguns cortes houve extravasamento de fragmentos do cimento, que permaneceu envolvido por tecido conjuntivo (periósteo).

Cavidade cirúrgica C2 (EGA)

As secções revelam solução de continuidade marcadamente regular delimitando o teto e o assoalho da cavidade óssea. Observa-se a presença da esponja de gelatina na região mais profunda da cavidade. Há fibroplasia e neoformação óssea trabecular na região central do canal medular e tecido ósseo ocluindo a cavidade. Observa-se intensa angiogênese.

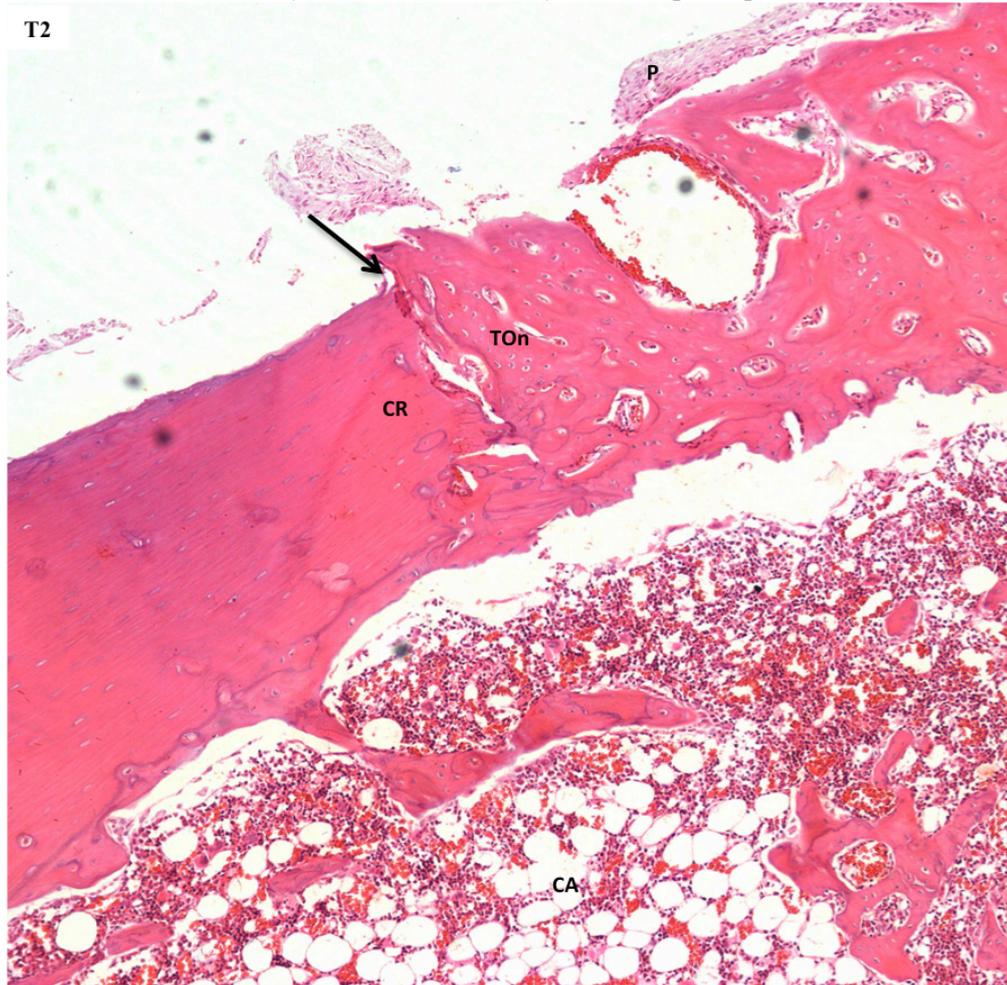
Figura 19 – 30 dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Cavidades T1, T2, C1 e C2 – (aumento 40x) – T1: Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON), ocluindo a cavidade. T2: Observa-se o intenso tecido ósseo neoformado (TON) ocluindo a cavidade, e angiogênese (AG). C1: Implantação (região proximal do fêmur) de bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON). C2: Observa-se (região central do fêmur) a esponja de gelatina absorvível (EGA) e tecido ósseo neoformado (TON).

Figura 20 – Cavidade T2 (com EGA + CTAD), 30 dias pós-operatórios (aumento 100x)



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se a marcada divisão (seta) entre a cortical remanescente (CR) e o tecido ósseo neoformado (TON). Sobre o TON observa-se o Perióstio (P). No canal medular, verifica-se as células adiposas (CA), com aspecto celular compatível com sinal de normalidade.

Período de 60 dias (Figura 21)

Cavidade cirúrgica T1 (α -CFtC + células)

As secções revelam a estabilidade dos fragmentos de cimento na cavidade ostectomizada. Em todas as secções, observa-se intensa neoformação óssea na porção central e no teto da ferida, sugerindo progressiva substituição destes por tecido ósseo e oclusão da ferida. Canal medular com dimensões e celularidade compatíveis com sinais de normalidade. Observa-se intensa angiogênese.

Cavidade cirúrgica T2 (EGA + células)

As secções revelam processo de reparo na cortical óssea do teto da cavidade, apresentando volume ósseo compatível com normalidade na área. Progressiva neoformação óssea ocluindo a

cortical óssea (Figura 21). Canal medular com dimensões e aspecto celular compatíveis com sinal de normalidade.

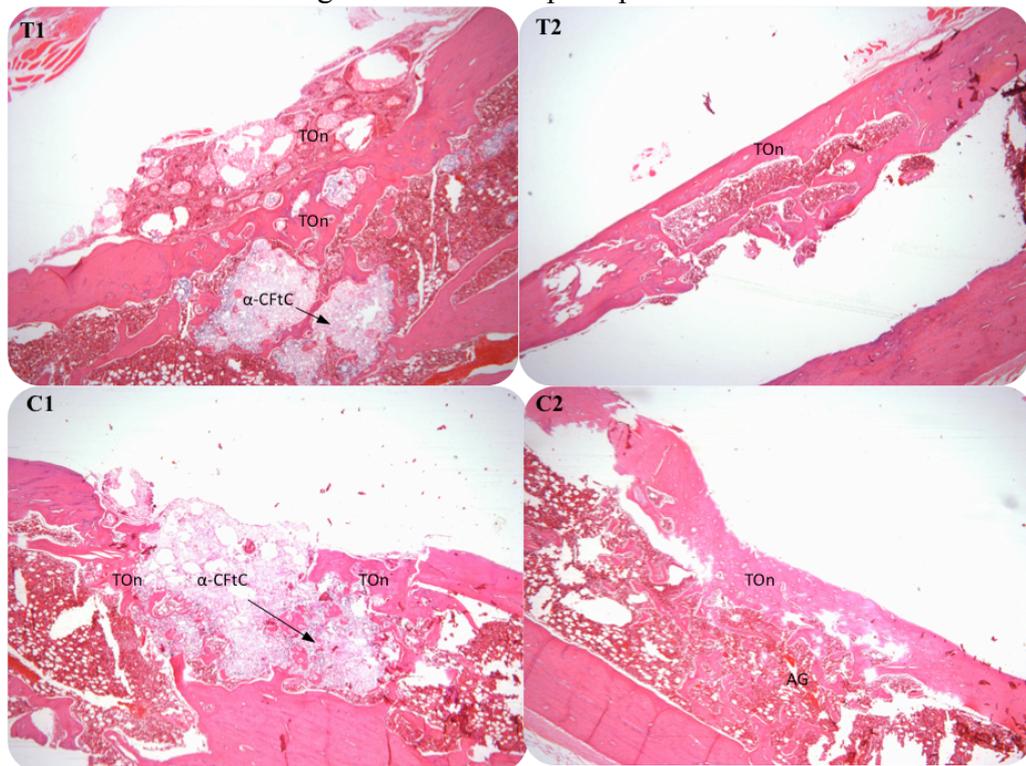
Cavidade cirúrgica C1 (α -CFtC)

Observa-se a estrutura inorgânica (α -CFtC) em fragmentos no interior da cavidade córtico-medular. Em todas secções observa-se neoformação óssea trabecular esparsa. A neoformação óssea apresenta-se desorganizada.

Cavidade cirúrgica C2 (EGA)

As secções revelam processo de reparo na cortical óssea do teto da cavidade. Progressiva neoformação óssea ocluindo a cortical óssea. Há neoformação óssea trabecular na região central e teto do canal medular. Observa-se intensa angiogênese.

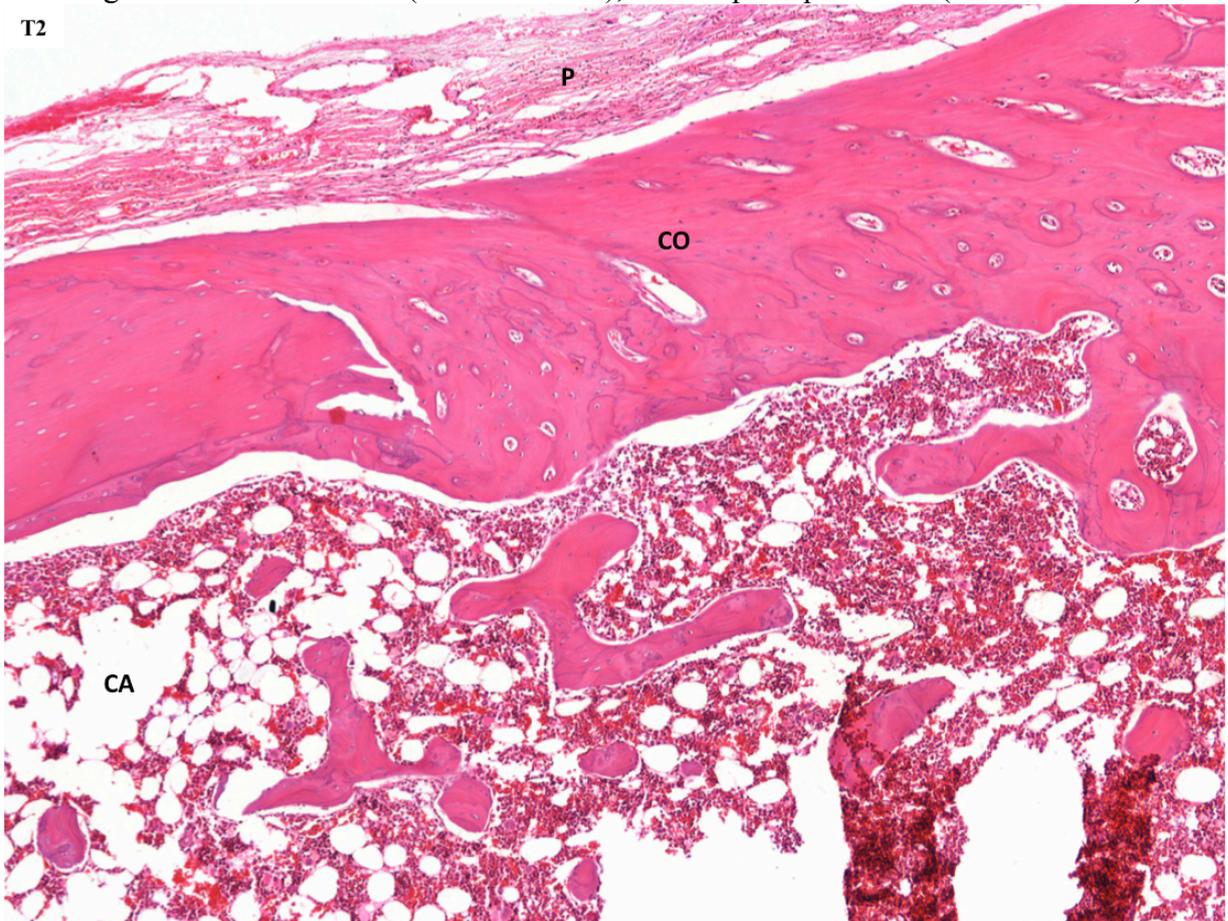
Figura 21 – 60 dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Cavidades T1, T2, C1 e C2 – (aumento 40x) - T1: Bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), em fragmentos. Observa-se tecido ósseo neoformado (TON), ocluindo a cavidade. T2: tecido ósseo neoformado (TON) e a oclusão total da cavidade. C1: Bloco de cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC). Observa-se tecido ósseo neoformado (TON) nas bordas da ferida. C2: tecido ósseo neoformado (TON) ocluindo o defeito ósseo e, sob a nova cortical, a angiogênese (AG).

Figura 22 – Cavidade T2 (EGA + CTAD), 60 dias pós-operatórios (aumento 100x)



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se o periósteo (P) sobre a cortical óssea ocluída (CO) e as células adiposas (CA) do canal medular.

5.2.1 Histomorfometria

Para a confirmação da calibração intra e inter examinador, aplicou-se o teste T para amostras pareadas, associado ao gráfico de Bland-Altman. O teste T não demonstrou diferença entre as médias em ambas as análises, assim como o gráfico de Bland-Altman apresenta pouca dispersão entre os dados, certificando a existência de concordância.

A análise histomorfométrica que avaliou a porcentagem de osso neoformado nas cavidades teste e controle, nos diferentes tempos experimentais, não revelou diferença estatística significativa (Tabelas 3 e 4).

A análise histomorfométrica que avaliou a oclusão das cavidades teste e controle que utilizaram cimento de fosfato de cálcio - α -CFtC (T1 e C1), revelou diferença estatística nos tempos de sete e 60 dias, $p < 0,05$. Estes resultados mostraram que, no grupo Teste (T1), que

recebeu células-tronco, houve maior oclusão das cavidades nos tempos de sete e 60 dias. Nos tempos de 14 e 30 dias, não houve diferença estatística (Tabela 3).

Nos tempos de 14 e 30 dias, nas cavidades com α -CFtC, a análise histomorfométrica revelou que nos grupos testes houve menor oclusão das cavidades, apesar desta diferença não mostrar-se significativa. Porém, ainda assim, o estudo descritivo mostra maior exuberância de tecido ósseo neoformado em todo espaço da cavidade, nos Grupos Testes, que utilizaram o cimento, em 14 e 30 dias (Tabela 3).

A análise histomorfométrica que avaliou a oclusão das cavidades teste e controle que utilizaram EGA (T2 e C2), revelou diferença estatística no tempo 14 dias, para um $p < 0,05$. Estes resultados mostraram que no grupo Teste (T2), que recebeu células-tronco, houve maior oclusão das cavidades no tempo de 14 dias. No tempo de sete dias, não houve diferença estatística. Nos tempos de 30 e 60 dias não foi possível o cálculo estatístico, visto que as cavidades fechadas recebiam o valor 0 e portanto entravam na contagem absoluta. Desta forma, pela contagem absoluta descritiva, aos 60 dias, pode-se observar que o grupo Teste (T2) apresentou 100% das cavidades fechadas, e o grupo controle (C2) apresentou apenas metade das cavidades ocluídas (Tabela 4).

Durante as análises histomorfométricas, pode-se observar um padrão de fechamento das cavidades preenchidas com cimento na porção mais próxima a região medular do defeito ósseo, enquanto que, no espaço da cavidade preenchido por gel, esse padrão de oclusão inverteu-se, com fechamento frequentemente em região superficial da ferida.

Podemos inferir, portanto, que o uso de células-tronco, em cavidades cirurgicamente criadas em fêmures de ratos, associado ao uso de material aloplástico (α -CFtC), sugere maior neoformação óssea nos tempos de sete e 60 dias pós-operatórios, quando comparadas às cavidades sem células-tronco. Nas cavidades que utilizaram EGA, associadas às células tronco, sugere-se maior neoformação óssea em 14 e 60 dias pós-operatórios, quando comparadas às que não receberam as células-tronco.

Quando comparados todos os grupos, observa-se que a análise por porcentagem de tecido ósseo neoformado não é estatisticamente significante, porém a análise da oclusão das cavidades mostrou-se significante para um $p < 0,05$. Os resultados sugerem que houve maior fechamento das cavidades teste (com presença de células-tronco) quando comparadas às cavidades controle (sem células-tronco) (Figura 23).

Tabela 3 – Comparação da análise histomorfométrica entre testes e controles com, α -CFtC, aos sete, 14, 30 e 60 dias

	Sete d			14 d			30 d			60 d		
	T	C	p	T	C	p	T	C	p	T	C	p
Análise de osso neoformado (%)	29,2 ±17,9	10,1 ±9,8	0,127	24,3 ±16,6	29,0 ±1,4	0,732	36,4 ±15,4	25,6 ±6,4	0,246	42,6 ±8,4	40,2 ±9,7	0,772
Análise de defeito ósseo (pixel)	702,1 ±454,1	1537,5 ±218,6	0,016	1259,8 ±45,5	869,7 ±265,5	0,145	545,7 ±247,6	95,3 ±0	0,256	288,1 ±58,1	492,0 ±19,9	0,042
Cavidades ocluídas	0	0	1,000	1	0	0,999	1	3	0,486	2	0	0,467

Fonte: Autora.

Os resultados revelam significância um $p < 0,05$, conforme grifado em vermelho, na análise do defeito ósseo em sete dias ($p=0,016$) e em 60 dias ($p=0,042$).

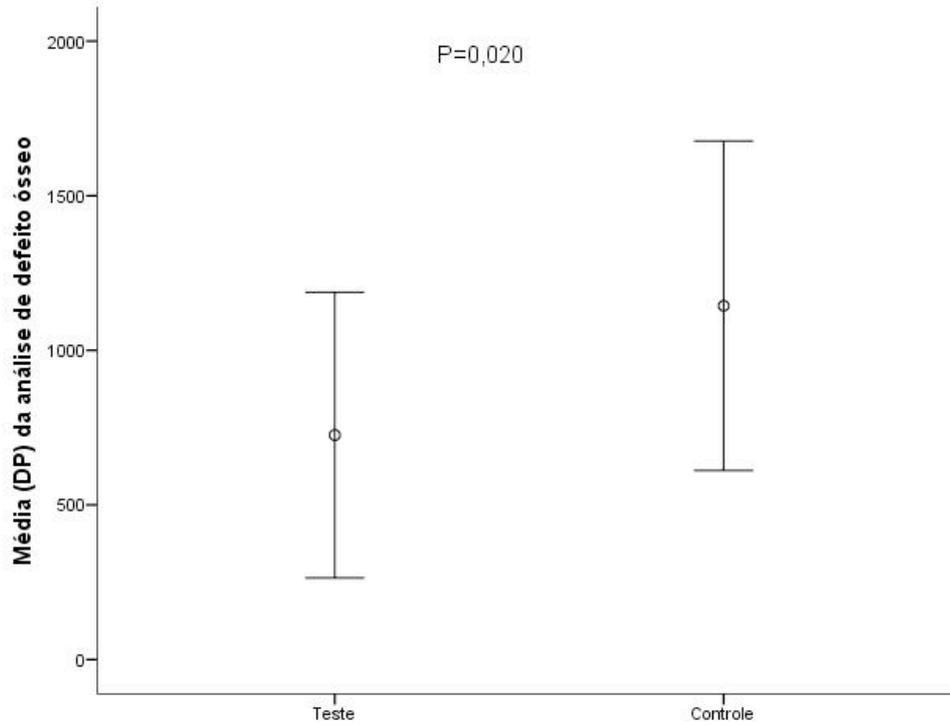
Tabela 4 – Comparação da análise histomorfométrica, entre testes e controles, com EGA, aos sete, 14, 30 e 60 dias

	Sete d			14 d			30 d			60 d		
	T	C	p	T	C	p	T	C	p	T	C	p
Análise de osso neoformado (%)	19,2 ±19,2	7,3 ±2,5	0,303	27,1 ±6,4	32,6 ±0	0,538	42,8 ±18,5	36,1 ±15,0	0,596	36,8 ±6,5	36,4 ±11,8	0,959
Análise de defeito ósseo (pixel)	1089,4 ±508,3	1658,5 ±180,4	0,087	28,0 ±0	1156,9 ±153,4	0,024	777,2	302,4	-	-	1489,6	-
Cavidades ocluídas	1	0	0,999	2	0	0,400	3	3	1,000	4	2	0,429

Fonte: Autora.

Os resultados revelam significância $p < 0,05$, conforme grifado em vermelho, na análise do defeito ósseo, em 14 dias ($p=0,024$). Em 60 dias, observa-se as cavidades ocluídas sendo de 100% no Grupo Teste.

Figura 23 – Gráfico de comparação da análise da oclusão das cavidades, entre grupos testes e controles, com α -CFtC e EGA, nos tempos experimentais de sete, 14, 30 e 60 dias pós-operatórios



Fonte: Autora.

Legenda: Observa-se que nos grupos testes as medições se aproximam mais do valor 0 (zero), indicando uma maior oclusão das cavidades teste.

6 DISCUSSÃO

O número de animais utilizado justifica-se, uma vez que a quantidade de animais isogênicos disponíveis é reduzida, concordando com os conceitos atuais de bioética, segundo Goldim e Raymundo,⁹⁵ em 2003. Desta forma, neste modelo proposto utilizou-se fêmures de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR, para avaliação do processo de reparo ósseo, em cavidades cirurgicamente confeccionadas. Ainda dentro dos conceitos da bioética, garantiram-se as melhores condições de alojamento e alimentação destes animais, assegurando-se o atendimento das necessidades básicas aos mesmos.⁹⁵

O uso freqüente de tais espécimes animais em experimento ocorre, por estes facilitarem tecnicamente o acesso e manipulação, apresentarem um menor custo financeiro e revelarem-se adaptados aos objetivos propostos.^{8-10,17,42,49,50,52,58,60,74-77,86,87,96}

Os animais selecionados, todos machos, com cinco meses de idade e peso médio de 304g excluíram qualquer viés quanto às condições de reparo ósseo, como considerado nos estudos de Schmitz e Hollinger.¹⁶ Além disso, as cavidades teste e controle foram realizadas no fêmur direito de animais diferentes, evitando que a presença das células-tronco interferisse nas cavidades que não receberam as células. A presença de numerosas células adiposas constatadas na medula hematopoiética sadia comprova a maturidade do tecido ósseo dos animais selecionados para o presente trabalho, conforme citado por Burkitt, Young e Heath.⁵

Tanto nas análises histológicas quanto nos exames por imagem, pode-se observar que, quando completado o reparo, o tecido ósseo não deixa cicatriz, não havendo mais evidência da lesão anterior, concordando com as afirmações de Feinberg, Steinberg e Helman⁴ e corroborando os achados de Puricelli et al.,⁹ e Corsetti.¹⁰

Nos tempos experimentais iniciais, sete e 14 dias, observa-se em todas as amostras ser mais evidente a fase inflamatória, através da presença de infiltrado inflamatório e hemácias (ILP), concordando com os padrões citados por Junqueira e Carneiro.²

Observa-se que a fibroplasia ocorre mais intensamente na cavidade preenchida apenas com a esponja (EGA), principalmente nos Grupos Controles 14 e 30 dias, que não receberam as células-tronco, o que indica reparo ósseo mais lento. A literatura mostra que o tecido conjuntivo tem uma maior taxa de proliferação e migração celulares,¹¹ por isso as cavidades ósseas devem ser, idealmente, preenchidas. Acredita-se que o cimento de fosfato de cálcio (α -CFtC), como osteocondutor, potencialize o próprio reparo ósseo, ao servir como suporte e alojamento das células.

Este estudo realizou a ostectomia das cavidades, onde o tecido ósseo removido não foi reutilizado conforme nomenclatura de Puricelli.¹³ Para este fim, utilizaram-se brocas trefinas, onde concordamos quanto à padronização do tamanho do defeito ósseo.¹⁴ Em todos os grupos e tempos experimentais, neste estudo, verificou-se a marcada regularidade da estrutura cortical ostectomizada. A broca trefina mostrou-se eficaz na padronização da confecção das cavidades e na manutenção do tecido ósseo adjacente sadio, concordando com Ilankovan et al.¹⁴

Estas cavidades cirurgicamente criadas, segundo Puricelli, apresentam apenas uma cortical rompida, permitindo assim, as condições indispensáveis para reprodução de um calo ósseo.^{9,10,17} Ao contrário, autores como Burkitt, Young e Heath,⁵ propõem as fraturas ósseas como modelo de estudo dos reparos ósseos. Entretanto, este método por fratura pode ser dificultado pela necessidade de meios de fixação óssea associados a animais de médio e grande porte.

As cavidades cirúrgicas tiveram dimensões de 3,1mm de diâmetro e 3,5mm de profundidade na diáfise óssea, sendo definidas segundo comprimento e espessura dos fêmures dos animais, que são de aproximadamente 35mm e 4,1-4,5mm, respectivamente. Concordamos com Khojasteh et al.⁶⁴ quando afirmam que não existe um protocolo estabelecido quanto ao tamanho e local das cavidades ósseas, porém este protocolo, idealizado por Puricelli, reproduziu resultados compatíveis com reparo ósseo em primeira intenção e mostrou-se adequado para o estudo.^{9,10,17}

Confirma-se a biocompatibilidade do cimento de fosfato tricálcico (α -CFtC), desenvolvida por Santos,²⁸ já testado por Puricelli et al.⁹, em 2010. A ausência de um compromisso inflamatório ou reação a corpo estranho, exuberante ou duradoura, fez-se clara em todas as cavidades que receberam o implante do referido cimento. A literatura concorda com a biocompatibilidade deste tipo de cimento, independente de sua composição aditiva²⁰⁻²⁶. Paralelamente à biocompatibilidade, os materiais implantados devem ter características de serem reabsorvidos enquanto o tecido ósseo é neoformado. Esta propriedade denominada osteotransdutividade é verificada já no período de sete dias nas cavidades que receberam o α -fosfato tricálcico (α -CFtC) e as CTAD.²⁸ Nas secções, observa-se neoformação óssea nas bordas do cimento.

Para este estudo, realizou-se modificações na composição do cimento para permitir a incorporação de poros na estrutura, através da adição de surfactante lauril sulfato de sódio, e, assim, permitir o crescimento de tecido ósseo para o interior do material. O bloco apresentou-se, portanto, mais poroso e fragmentado nos cortes histológicos. Isto pode sugerir que uma

maior área de contato com o tecido ósseo, acelere o processo de reparo, se comparado com o estudo de Puricelli et al.,⁹ onde com 60 dias de controle, as cavidades mantinham-se abertas. Diversos estudos sobre biomateriais ressaltam a importância da composição e da microestrutura porosa do material utilizado.^{37,56-60}

A literatura descreve discordâncias sobre as dimensões dos microporos. Estes devem ter de 100 a 500 μm ^{61,62} e 200 a 400 μm ⁶³ de diâmetro, para permitir a adesão celular à superfície mineralizada. Este estudo utilizou um cimento com poros que, segundo Santos (2002), variou de 100 e 800 μm de diâmetro, permitindo assim a proliferação celular (osteoblastos) no interior do cimento. Salientando-se as dimensões porosas dos blocos, deve-se referir sua possível compatibilidade volumétrica para alojamento, crescimento e transporte das células-tronco, cujas dimensões atingem cerca de 2 μm cada.

As radiografias determinam a identificação das fraturas ocorridas e a localização para o preparo dos cortes histológicos, corroborando com os autores Zhao et al.²⁹ Este exame radiográfico não foi eficaz como instrumento para análise visual de reparo ósseo em fêmures de ratos (Tabela 2).

Já na TCFC, os resultados da análise por escores mostraram diferença significativa, onde a densidade mais próxima ou igual ao tecido ósseo foi maior nos Grupos Testes (76,7%) do que nos Grupos Controles (42,9%). Este exame por imagem vai de encontro com os resultados da histomorfometria, que verifica um processo de reparo ósseo mais acelerado em sete e 60 dias nos grupos testes. Concordamos com os autores^{31,32} quanto a acurácia do exame TCFC, porém este trabalho é inédito quanto ao uso deste exame em fêmures de ratos. Para as autoras deste estudo a condição das imagens individuais geradas pela TCFC somam informações visuais em distintos níveis, ampliando numericamente a possibilidade de exames comparativos de cada unidade e entre as demais. Esta experiência já desenvolvida neste trabalho, sugere novos trabalhos dando continuidade para novos resultados estatísticos.

As medidas realizadas nos fêmures (*in vivo*) dos animais deste estudo corresponderam às medidas apresentadas na TCFC, sendo de 35mm de comprimento e 4,5mm de espessura proximal, 4,1mm de espessura central e 3,0mm de espessura distal (Figura 6), concordando com estudos de Ludlow et al.³¹ e Ballrick et al.³² Isto significa que as dimensões geradas no exame de TCFC são confiáveis e poderão ser usadas *in vivo*, o que libera por a exclusão por morte de animais contidos em pesquisas com maiores tempos de observação.

Os cortes histológicos foram corados com HE, visto ser a coloração de eleição para avaliação de reparo ósseo, no que concordamos com os autores.^{29,34,35}

Na análise histomorfométrica, o padrão proposto na literatura é a medida de porcentagem de tecido neoformado com relação ao defeito total.^{29,34,35} Como neste experimento, foi realizada a medição parcial do defeito, tendo sido estabelecido para mensuração a área adjacente a uma das corticais, realizou-se ainda a medição da abertura das cavidades, nos diferentes tempos experimentais. A dimensão da cavidade foi medida em valor absoluto (40x), visto que as duas corticais apresentavam aspectos de neoformação óssea semelhantes, optou-se por medir a porcentagem só de uma das corticais. O aumento captado foi de 100x. O corte regular e uniforme da cortical, como observado em todas secções, possibilitou a padronização do tamanho da área a ser medida.

Quanto ao uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTAD), os cortes dos grupos Testes, que receberam as células-tronco revelaram-se ausentes de reação a corpo estranho, concordando com os autores,³⁷ que afirmam que estas células são isentas de problemas de rejeição imunológica. Os estudos mais atuais têm utilizado com maior frequência as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAD),⁴⁵⁻⁴⁹ porém não existe um consenso quanto a escolha da origem destas células,⁶⁴ fato que deve estimular as pesquisas para elaboração de um protocolo.

Assim como citados na literatura, como mais frequentes, os "scaffolds" utilizados neste estudo foram: esponja de gelatina absorvível,⁷⁴ cimentos de fosfato de cálcio.⁷⁵⁻⁸⁴

Nos tempos experimentais de sete e 60 dias, as células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTAD), quando associadas ao cimento de fosfato (α -CFtC), mostraram aceleração no fechamento das cavidades em fêmures de ratos. Quando utilizadas associadas com EGA, mostraram maior aceleração apenas no tempo de 14 dias. Os estudos por análise visual por escores, dos exames por imagem (TCFC), também revelam uma tendência de aceleração do processo de reparo ósseo nos grupos Testes (que utilizaram as células-tronco). Estes resultados sugerem e confirmam o potencial das CTMs em acelerar o reparo ósseo em modelos experimentais *in vivo*.^{42,49,50,56,58,59}

Nos tempos de 14 e 30 dias, nas cavidades com α -CFtC, a análise histomorfométrica revelou que nos grupos testes houve menor oclusão das cavidades, porém, ainda assim, o estudo descritivo mostra maior exuberância de tecido ósseo neoformado em todo espaço da cavidade, nos Grupos que utilizaram células-tronco e α -CFtC, nestes tempos experimentais. Os autores acreditam haver a necessidade de melhores técnicas de mensuração da neoformação óssea não apenas na região corticotomizada, como também em profundidade.

Diversos autores concordam que a associação de um biomaterial cerâmico às células-tronco, de suas diversas origens, parece favorecer e acelerar o processo de reparo ósseo,^{44,50-53}

como constatado neste estudo nos tempos experimentais de sete e 60 dias.

7 CONCLUSÕES

A metodologia empregada na realização deste experimento permite concluir que, através da análise histológica descritiva do reparo ósseo, em fêmur de rato, no Grupos Testes, que receberam células-tronco, houve uma maior exuberância de tecido ósseo neoformado, ausência de fibroplasia em todos os cortes deste Grupo e aceleração do processo de oclusão das cavidades, em ambos biomateriais. Observa-se que a neoformação óssea nestas cavidades apresenta-se adiantada em relação as cavidades do Grupo Controle.

Comparativamente entre os Grupos Testes e Controles, nos tempos experimentais empregados, a partir da **análise por escores dos exames por imagem** (Radiografia e TCFC), conclui-se que:

- a) a radiografia que utiliza filme dental não revelou diferença entre os Grupo estudados;
- b) pode-se sugerir, que os resultados da análise por escores, na TCFC, as cavidades que receberam as células-tronco (Grupos Testes), tiveram uma aceleração no processo de reparo ósseo.

Comparativamente entre os Grupos Testes e Controles, nos tempos experimentais empregados, a partir da **histomorfometria**, conclui-se que:

- a) a utilização de células-tronco, associada ao material aloplástico (α -CFtC), osteocondutor, sugere aceleração do processo de reparo ósseo, em ratos, em sete e 60 dias pós-operatórios, quando comparadas às cavidades sem células-tronco;
- b) a utilização de células-tronco, associada a EGA, sugere aceleração do processo de reparo ósseo, em ratos, em 14 e 60 dias pós-operatórios, quando comparadas às cavidades sem células-tronco. Aos 60 dias, pode-se observar que o grupo Teste apresentou 100% das cavidades fechadas e o grupo controle apresentou apenas metade das cavidades ocluídas;
- c) as cavidades preenchidas com EGA, que não receberam células-tronco, quando comparadas com as cavidades que receberam as CTAD, aos 14 e 30 dias, apresentaram intensa fibroplasia e conseqüente atraso na ossificação endóstea.

REFERÊNCIAS

1. KESSEL, R. G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: KESSEL, R. G. (Ed.). **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 129-146.
2. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (Ed.). **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
3. SCHAWN, L.; SOUZA, A. C. A. Imobilização e osteoporose. In: JECKEL-NETO, E. A.; CRUZ, I. B. M. (Ed.). **Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000. p. 253-274.
4. FEINBERG, S. E.; STEINBERG, B.; HELMAN, J. I. Healing of traumatic Injuries. In: FONSECA, R. J.; WALKER, R. V. (Ed.). **Oral and maxilofacial trauma**. Philadelphia: Saunders, 1991. v. 1, cap. 2, p. 13-57.
5. BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater histologia funcional**. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
6. GUIMARÃES, S. A. C. Processo de reparo. In: GUIMARÃES, S. A. C. **Patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. Cap. 8, p. 282-315.
7. CHALMERS, J.; GRAY, D. H.; RUSH J. Observations of the induction of bone in soft tissues. **J. Bone Joint. Surg. Br.**, London, v. 57, n. 1, p. 36-45, Feb. 1975.
8. SCHILLING, T. et al. Influence of inflammation-mediated osteopenia in the regional acceleratory phenomenon and the systemic acceleratory phenomenon during healing of a bone defect in the rat. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 63, n. 7, p. 160-166, Aug. 1998.
9. PURICELLI, E. et al. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. **Head Face Med.**, London, v. 6, n. 10, p. 10, 2010.
10. CORSETTI, A. **Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implante de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno**. 2005. 122 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
11. DAHLIN, C. Scientific background of guided bone regeneration. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**. Chicago: Quintessence, 1994. Cap. 2, p. 31-48.
12. SCHENK, R. K. et al. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 9, n. 1, p. 13-29, Jan./Feb. 1994.

13. PURICELLI, E. Retenção dentária: novos conceitos no tratamento ortocirúrgico. In: GONÇALVES, E. A. N.; FELLER, C. **Atualização na clínica odontológica: a prática da clínica geral**. São Paulo: Artes Médicas, 1998. Cap. 1, p. 3-28.
14. ILANKOVAN, V. et al. A prospective study of trephined bone grafts of the tibial shaft and iliac crest. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, London, v. 36, n. 6, p. 434-439, 1998.
15. FRAME, J. W. A composite of porous calcium sulfate dihydrate and eyanoacrylate as a substitute for autogenous bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 38, n. 4, p. 251-256, 1980.
16. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Res.**, Philadelphia, n. 205, p. 299-307, Apr. 1986.
17. ULBRICH, L. M. **Avaliação do efeito de um campo magnético permanente na cicatrização óssea em fêmures de ratos**. 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas, Área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
18. WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials. **Elsevier Scientific**, Amsterdam, p. 72, 1987.
19. RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics: materials, properties, applications**. New York: Chapman & Hall, 1992.
20. MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E. Calcium phosphate cements: study of the b-tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. **Biomaterials**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 83-88, 1990.
21. MIRTCHI, A. A.; LEMAITRE, J.; MUNTING, E. Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of b-tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. **Biomaterials**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 505-510, 1991.
22. CHOW, L. C. et al. Self-setting calcium phosphate cements. **Mater. Res. Soc. Symp. Proc.**, v. 179, p. 3-24, 1991.
23. CHOW, L. C. Development of self-setting calcium phosphate cements. **J. Ceram. Soc. Jap. (The Centennial Memorial Issue)**, v. 99, n. 10, p. 954-964, 1991.
24. BERMUDEZ, O. et al. Development of some calcium phosphate cements from combination of α -TCP, MCPM and CaO. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, London, v. 5, p. 160-163, 1994.
25. ISHIKAWA, K. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. **Biomaterials**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 527-532, 1995.
26. MIYAMOTO, Y. et al. *In vivo* setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. **Biomaterials**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 855-860, 1995.

27. LEGEROS, R.; CHOAYEB A.; SHULMAN, A. Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 61, p. 343-47, 1982.
28. SANTOS, L. A. **Cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras**. 2002. 249 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
29. ZHAO, M. et al. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. **Microsurgery**, New York, v. 31, n. 2, p. 130-137, 2011.
30. MAKI, K. et al. Computer-assisted simulations in orthodontic diagnosis and the application of a new cone beam x-ray computed tomography. **Orthod. Craniofac. Res.**, Oxford, v. 6, p. 95-101, 2003. Suppl. 1.
31. LUDLOW, J. B. et al. Accuracy of measurements of mandibular anatomy in cone beam computed tomography images. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 103, n. 4, p. 534-542, Apr. 2007.
32. BALLRICK, J. W. et al. Image distortion and spatial resolution of a commercially available cone beam computed tomography machine. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 134, n. 4, p. 573-582, Oct. 2008.
33. LOUBELE, M. et al. Image quality vs radiation dose of four cone beam computed tomography scanners. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Houndsmills, v. 37, n. 6, p. 309-318, Sept. 2008.
34. SCHOFER, M. D. et al. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with bmp-2 for reconstruction of bone defects. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e25462, Sept. 2011.
35. DINARVAND, P. et al. New approach to bone tissue engineering: simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly (L-lactic acid) scaffold. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, v. 3, n. 11, p. 4518-4524, Nov. 2011.
36. KASTEN, P. et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 29, p. 5879-5889, Oct. 2005.
37. MEIRELLES, L. D. A. S.; NARDI, N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 123, n. 4, p. 702-711, Nov. 2003.
38. CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, Washington, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.
39. ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. **Stem Cells**, Dayton, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2003.

40. FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp. Hematol.**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.
41. JAVASON, E. H. et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. **Stem. Cells**, Dayton, v. 19, n. 3, p. 219-225, 2001.
42. MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 119, Pt. 11, p. 2204-2213, June 2006.
43. SLOAN, A. J.; WADDINGTON, R. J. Dental pulp stem cells: what, where, how? **Int. J. Paediatr. Dent.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 61-70, 2009.
44. LIU, H. C. et al. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly (L-lactide). **Tissue Eng. Part A**, New York, v. 17, n. 19-20, p. 2417-2433, 2011.
45. BOHNENBLUST, M. E. et al. An experimental design to study adipocyte stem cells for reconstruction of calvarial defects. **J. Craniofac. Surg.**, Boston, v. 20, n. 2, p. 340-346, Mar 2009.
46. YOON, E. et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. **Tissue Eng.**, New York, v. 13, n. 3, p. 619-627, Mar. 2007.
47. LI, H. et al. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 356, n. 4, p. 836-842, May 2007.
48. LIN, Y. et al. Bone regeneration by BMP-2 enhanced adipose stem cells loading on alginate gel. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 129, n. 2, p. 203-210, Feb. 2008.
49. WILSON, S. M. Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 70, n. 3, p. e193-e203, Mar. 2012.
50. HULTH, A.; JOHNELL, O.; HENRICSON, A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, n. 234, p. 235-239, Sept. 1988.
51. MARINAK, K. W.; MELLONIG, J. T.; TOWLE, H. J. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n. 1, p. 12-18, 1989.
52. GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V. M.; CAPLAN, A. I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, n. 262, p. 298-311, 1991.

53. LOHMANN, C. H. et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 121, n. 10, p. 583-590, 2001.
54. BOO, J. S. et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. **J. Craniof. Surg.**, Boston, v. 13, n. 2, p. 231-239, Mar. 2002.
55. KIM, C. S. et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carrier. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 15, p. 2501-2507, 2005.
56. GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V. M.; CAPLAN, A. I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, n. 262, p. 298, 1991.
57. NIEDZWIEDZKI, T. et al. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 115-119, 1993.
58. MANKANI, M. H. et al. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 136, n. 3, p. 263-270, Mar. 2001.
59. SHANG, Q. et al. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J. Craniofac. Surg.**, Boston, v. 12, n. 6, p. 586-593, Nov. 2001.
60. PELISSIER, P. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within macroporous ceramic in rats. **Plast. Reconstr. Surg.**, Hagerstown, v. 111, n. 6, p. 1932-1941, May 2003.
61. KOKUBUN, S.; KASHIMOTO, O.; TANAKA, Y. Histological verification of bone bonding and ingrowth into porous hydroxyapatite spinous process spacer for cervical laminoplasty. **Tohoku J. Exp. Med.**, Sendai, v. 3, n. 173, p. 337-344, Jul. 1994.
62. GAUTHIER, O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 19, n. 1-3, p. 133-139, Jan./Feb. 1998.
63. MARTINS, A. C. O. **Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + β -fosfato tricálcio e osso autógeno.** 2010. 180 f. Dissertação (Mestrado em Estomatologia e Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
64. KHOJASTEH, A. et al. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 70, n. 4, p. 972-982, Apr. 2012.
65. FRIEDMAN, M. S.; LONG, M. W.; HANKENSON, K. D. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. **J. Cell Biochem.**, New Jersey, v. 98, n. 3, p. 538-554, Jun. 2006.

66. MÜLLER, P. et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Cell Mol. Med.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 281-291, Jan./Feb. 2008.
67. LIN, L.; CHOW, K. L.; LENG, Y. Study of hydroxyapatite osteoinduc- tivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Biomed. Mater. Res. A**, New Jersey, v. 89, n. 2, p. 326-335, May 2009.
68. HOLTORF, H. L.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. Flow perfusion culture in- duces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell- scaffold constructs in the absence of dexamethasone. **J. Biomed. Mater. Res. A**, New Jersey, v. 72, n. 3, p. 326-334, Mar. 2005.
69. YE, C. P. et al. Culture media conditioned by heat-shocked osteoblasts enhances the osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Cell Biochem. Funct.**, Oxfröd, v. 25, n. 3, p. 267-276, May/June. 2007.
70. CSAKI, C. et al. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 131, n. 2, p. 251-266, 2009.
71. NA, K. et al. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo- reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 (BMP-2). **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 16, p. 2631-2637, June. 2007.
72. DE GIROLAMO, L. et al. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 154-157, Mar./Apr. 2007.
73. LU, H. et al. In vitro proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow- derived mes- enchymal stem cells cultured with hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) and β -TCP ceramics. **J. Biomater. Appl.**, London, v. 25, n. 1, p. 39-56, July. 2010.
74. AKITA, S. et al. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. **Wound Repair. Regen.**, St. Louis, v. 12, n. 2, p. 252-259, Mar./Apr. 2004.
75. KHOJASTEH, A.; ESLAMINEJAD, M. B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, New York, v. 106, n. 3, p. 356-362, Sept. 2008.
76. HENRICH, D. et al. Simultaneous cultivation of human endothelial-like differentiated precursor cells and human marrow stromal cells on beta-tricalcium phosphate. **Tissue Eng. Part C Methods**, New York, v. 15, n. 4, p. 551-560, Dec. 2009.
77. ZHANG, Z. Y. et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 6058-620, Feb. 2010.
78. LEE, L. T. et al. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or

without mesenchymal stem cells. **J. Chin. Med. Assoc.**, Taiwan, v. 71, n. 2, p. 66-73, Feb. 2008.

79. WAN, C.; HE, Q.; LI, G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model. **J. Orthop. Res.**, New Jersey, v. 24, n. 4, p. 610-618, 2006.

80. NIEMEYER, P. et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomater.**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 900-908, Mar. 2009.

81. JAFARIAN, M. et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, New York, v. 105, n. 5, p. e14-e24, 2008.

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

83. UEDA, M. et al. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. **Int. J. Periodont. Restorat. Dent.**, Chicago, v. 25, n. 2, p. 129-137, Apr. 2005.

84. SHAYESTEH, Y. S. et al. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, New York, v. 106, n. 2, p. 203-209, Aug. 2008.

85. ITO, K. et al. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 17, n. 5, p. 579, Oct. 2006.

86. CASTANO-IZQUIERDO, H. et al. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. **J. Biomater. Res. A**, New Jersey, v. 82, n. 1, p. 129-137, Jul. 2007.

87. KIM, J. et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenetic protein-2 and human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 10, p. 1830-1837, Apr. 2007.

88. LIU, H. W. et al. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis. **Tissue Eng.**, New York, v. 13, n. 5, p. 1113-1124, May 2007.

89. MARTIN, I. et al. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. **J. Orthop. Res.**, New Jersey, v. 16, n. 2, p. 181-189, Mar. 1998.

90. CORSETTI, A. et al. Avaliação da presença de microrganismos aeróbios em blocos de cimento de fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. **Rev. Fac. Odont.**

UPF, Passo Fundo, v. 13, n. 2, p. 27-32, maio/ago. 2008.

91. HCPA. **Implicações na prática da enfermagem**: atualização em centro de material e esterilização. Porto Alegre: HCPA, 2002. p. 61-80.

92. HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993.

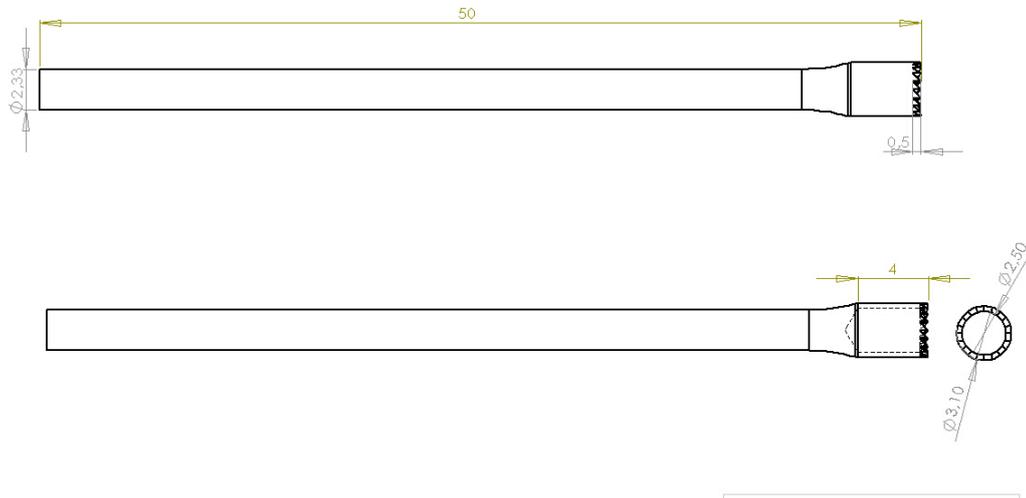
93. NARDI, N. B.; CAMASSOLA, M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 698, p. 151-160, 2011.

94. ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.**, New York, v. 7, n. 2, p. 211-228, Apr. 2001.

95. GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em animais**. Porto alegre: UFRGS, 2003. Disponível em: <<http://www.bioetica.ufrgs.br/animrt.html>>. Acesso em: 01 jul. 2005.

96. WANG, F. et al. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach of bone tissue regeneration. **Stem. Cells Dev.**, New Jersey, v. 20, n. 12, p. 2093-2102, Dec. 2011.

**ANEXO A – BROCAS TREFINA, DE 3,1MM DE DIÂMETRO EXTERNO E 2,5MM
DE DIÂMETRO INTERNO**



Promm

Nome da peça: Trefina
Material: Titânio - 2012
Dimensões em mm
Telefone: (051) 3342-3136

ANEXO B – RESOLUÇÃO NORMATIVA 04/97**UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM PROJETOS DE PESQUISA**

**Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA
Resolução Normativa 04/97**

A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde credenciada, junto a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde, como Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa submetidos à apreciação desta Comissão, com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas, dispõe que:

- a) a utilização de animais em pesquisas científicas deve ocorrer somente após ser provada a sua relevância para o avanço do conhecimento científico, considerando-se a impossibilidade de utilização de métodos alternativos como: modelos matemáticos; simulações computadorizadas; sistemas biológicos “*in vitro*” ou outro método adequado;
- b) a espécie utilizada e o cálculo do tamanho da amostra devem ser adequados para a obtenção de resultados válidos;
- c) deve ser oferecido alojamento, transporte, alimentação e cuidados adequados à espécie através de assistência qualificada;
- d) procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, salvo quando forem os mesmos o objetivo da pesquisa. Devem ser, igualmente, observados cuidados com assepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e estresse dos animais em estudo;
- e) necessitando de imobilização física e/ou de privação alimentar ou hídrica, os pesquisadores devem procurar manter estas condições pelo menor período de tempo possível, evitando prolongar a angústia, desconforto e dor;
- f) quando for necessário ao estudo, ou após o mesmo, se indicado, que os animais devam ser sacrificados, este procedimento deve ser realizado de forma rápida indolor e irreversível;
- g) as técnicas aceitas para o sacrifício de animais são as seguintes: hipoxia por barbitúricos, anestésicos inalatórios, dióxido de carbono e monóxido de carbono (engarrafado), metanesulfonato de tricáina, benzocaína e irradiação por microondas;
- h) as técnicas aceitas, de forma condicional, são as seguintes: hipoxia por deslocamento cervical, por nitrogênio ou argônio, decapitação, concussão cerebral e dano medular;
- i) não serão aceitas, salvo exceções extremamente justificadas, as seguintes técnicas de sacrifício de animais: sangramento, descompressão, congelamento rápido, embolismo gasoso, afogamento, atordoamento, uso isolado de estriquinina, nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, agentes curariformes, clorofórmio e cianeto.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 04/97 - Utilização de Recursos Financeiros em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões Científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 08 de maio de 1997.

ANEXO C – CÓDIGO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AOS ANIMAIS

**Lei Estadual Nº 11.915
21 de maio de 2003
Rio Grande do Sul**

Art. 17 - VETADO

TÍTULO II**CAPÍTULO I****Dos Animais de Laboratório****Seção I****Da Vivisseccção**

Art. 18 - Considera-se vivisseccção os experimentos realizados com animais vivos em centros de pesquisas.

Art. 19 - Os centros de pesquisas deverão ser devidamente registrados no órgão competente e supervisionados por profissionais de nível superior, nas áreas afins.

Art. 20 - É proibida a prática de vivisseccção sem uso de anestésico, bem como a sua realização em estabelecimentos escolares de ensino fundamental e médio.

Parágrafo único - Os relaxantes musculares parciais ou totais não serão considerados anestésicos.

Art. 21 - Com relação ao experimento de vivisseccção é proibido:

I - realizar experiências com fins comerciais, de propaganda armamentista e outros que não sejam de cunho científico humanitário;

II - utilizar animal já submetido a outro experimento ou realizar experiência prolongada com o mesmo animal.

Art. 22 - Nos locais onde está autorizada a vivisseccção, deverá constituir-se uma comissão de ética, composta por, no mínimo, 03 (três) membros, sendo:

I - um (01) representante da entidade autorizada;

II - um (01) veterinário ou responsável;

III - um (01) representante da sociedade protetora de animais.

Art. 23 - Compete à comissão de ética fiscalizar:

I- a habilitação e a capacidade do pessoal encarregado de prestar assistência aos

animais;

II - verificar se estão sendo adotados os procedimentos para prevenir dor e o sofrimento do animal, tais como aplicação de anestésico ou analgésico;

III - denunciar ao órgão competente qualquer desobediência a esta Lei.

Art. 24 - Todos os centros de pesquisas deverão possuir os recursos humanos e materiais necessários a fim de zelar pela saúde e bem-estar dos animais.

Seção II

Das Disposições Finais

Art. 25 - As penalidades e multas referentes às infrações definidas nesta Lei serão estabelecidas pelo Poder Executivo, em espécie.

Art. 26 - O Poder Executivo definirá o órgão estadual encarregado de fiscalizar o cumprimento das disposições desta Lei.

Art. 27 - O Poder Executivo regulamentará esta Lei no prazo de 30 (trinta) dias da data de sua publicação.

Art. 28 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 29 - Revogam-se as disposições em contrário.

PALÁCIO PIRATINI, em Porto Alegre, 21 de maio de 2003.

ANEXO D – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110159

Data da Versão do Projeto: 10/08/2011

Pesquisadores:

NANCE NARDI

VIVIANE NEVES PACHECO

ADRIANA CORSETTI

EDELA PURICELLI

Título: AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMURES DE RATOS APÓS IMPLANTE DE BLOCOS DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO ASSOCIADO A TERAPIA CELULAR

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 25 de agosto de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA