ROBERTA TARGA STRAMANDINOLI ZANICOTTI

Avaliação da interface osso-implante em mandíbula de miniporcos irradiados e o uso de células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na osseointegração

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zanicotti, Roberta Targa Stramandinoli

Avaliação da interface osso-implante em mandíbula de miniporcos irradiados e o uso de células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na osseointegração / Roberta Targa Stramandinoli Zanicotti. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: André Lopes Carvalho.

Descritores: 1.Radioterapia 2.Osseointegração 3.Implantes dentários
4.Transplante de células-tronco mesenquimais 5.Células-tronco 6.Plasma rico em
plaquetas 7.Miniporcos

USP/FM/DBD-398/13

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à todos os pacientes oncológicos submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço que necessitam de reabilitação oral.

Dedico também aos miniporcos brasileiros que foram utilizados nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Sueli** e **Roberto**, por tudo que me ensinaram. Não há palavras que possam expressar o quanto sou grata a vocês.

Ao meu esposo, **Rafael**, pelo amor e apoio em todos os momentos, e por ter conseguido me tolerar pacientemente durante estes quatro anos de doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **André Lopes Carvalho**, exemplo de profissional e pesquisador, pela didática, sabedoria científica e brilhantismo, tornando possível a realização conclusão deste trabalho.

Ao Dr. **Roger Chammas**, coordenador da pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo incentivo e crédito em minha pesquisa.

Ao **Dr. Jeremy Mao**, chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa da Universidade Columbia de Nova Iorque (EUA), pela oportunidade de estudar em uma universidade tão renomada.

Ao Dr. **Laurindo Moacir Sassi**, chefe do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba-PR, pela oportunidade, confiança, dedicação, orientação e principalmente amizade.

Ao Dr. **Paulo R. S. Brofman**, chefe do Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR, por ter acreditado em meu projeto e me dado a oportunidade de trabalhar com sua equipe.

À Dra. **Carmen Rebelatto**, bióloga do Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR, por toda orientação, ensinamentos, paciência, dedicação e amizade.

Ao Dr. **Geninho Tommé**, diretor da Neodent - Implantes Osteointegráveis, e à Dra. **Ivete Sartori**, coordenadora do Programa de Auxílio à Pesquisa da Neodent, pelo apoio e interesse em pesquisa científica.

À minha querida amiga e auxiliar de saúde bucal, **Sheila Albuquerque Freire**, por tudo que fez por mim durante este período, pelo carinho e dedicação com os animais e pela ajuda durante todo o experimento.

Aos profissionais do Laboratório de Cultivo Celular da PUCPR, **Dra. Alexandra Senegaglia, Lidiane Maria Boldrini-Leite, Fabiane Barchiki, Dr. Alejandro Correa Dominguez, Crisciele Kuligovsky** pela dedicação e ajuda prestada durante execução e elaboração deste trabalho.

Ao Dr. **Renato Paulo Chopard**, membro da coordenadoria de pós-graduação em Anatomia Funcional, pela disposição dos laboratórios do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

À **Marta Maria Rigueti** e ao **Boletta**, técnicos do laboratório do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade, auxílio e dedicação no processamento das lâminas.

À equipe do biotério da Universidade Positivo, em especial à médica veterinária Dra. **Maria Fernanda Torres**, e aos técnicos **Vanderlei Muller** e **Cirlei Aparecida**, por todo auxílio prestado, dedicação e carinho com os animais, e principalmente pelo compromisso e amizade.

Ao Dr. **Sérgio Araquém Mattos Ferreira** e Dr. **Gustavo Henrique Smaniotto**, do Serviço de Radioterapia do Hospital Erasto Gaertner, por terem apoiado e confiado no presente estudo.

À Dra. **Tatiane C. de Oliveira Fernandes**, chefe do Serviço de Física Médica do Hospital Erasto Gaertner, **Melissa Funchal** e aos técnicos em radiologia médica, pela dedicação profissional e carinho com os animais.

Ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Junior**, pela atenção e dedicação nos ensinamentos do manuseio do microscópico do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP.

Aos colegas e amigos Dra. **Juliana Lucena Schussel** e Dr. **Acir José Dischernabel** pelos conhecimentos, orientações, amizade e principalmente pelo incentivo e exemplo de pesquisadores.

À minha prima e médica veterinária **Paola Stramandinoli Branco**, pela ajuda prestada durante os experimentos cirúrgicos e à querida Eva Aparecida Rocha por cuidar com tanto carinho dos miniporcos.

À toda equipe do Hospital Erasto Gaertner pelo apoio e auxílio durante minha ausência, em especial Dr. **Fernando Zanferrari**, Dr. **José Luis Dissenha**, Dra. **Maria Isabela Guebur** e Dra. **Lúcia Ávila**, além de todos os residentes que me ajudaram auxiliando e fotografando os experimentos.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma me ajudaram a tornar possível esta realização.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento, estrutura e excelência.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo e pela oportunidade de realizar parte do meu doutorado na Universidade Columbia de Nova Iorque.

À Fundação Araucária, pelo apoio financeiro, o qual foi fundamental para a realização deste trabalho.

À NEODENT pela concessão dos implantes dentários como incentivo à pesquisa brasileira.

Ao Hospital Erasto Gaertner, por autorizar a realização das sessões de radioterapia nos animais.

À Universidade Positivo, por autorizar a realização dos procedimentos cirúrgicos e manutenção dos animais no biotério.

EPÍGRAFE

“Devíamos fazer do comum algo extraordinário e então nos surpreenderíamos descobrindo que está muito perto de nós a fonte de prazer que buscamos em algum lugar distante e difícil. Estamos muitas vezes a ponto de pisar na maravilhosa utopia mas acabamos olhando por cima dela com nosso telescópio”.

Ludwig Tieck

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	01
1.1 Osseointegração de implantes dentários.....	01
1.2 Instalação de implantes em alvéolo frescos.....	03
1.3 Efeitos da radioterapia na osseointegração.....	04
1.4 Terapia celular e células-tronco mesenquimais.....	07
1.5 Plasma rico em plaquetas.....	10
1.6 Estudos com células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na regeneração óssea.....	12
1.7 Suínos e miniporcos como modelo experimental.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MÉTODOS.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Técnica anestésica e controle da dor pós-operatória.....	20
4.3 Coleta da medula óssea.....	21
4.4 Isolamento das células mononucleares e cultura das células mesenquimais	21
4.5 Viabilidade celular.....	23
4.6 Análise e caracterização celular.....	23
4.7 Procedimentos de diferenciação celular.....	24
4.7.1 Diferenciação osteogênica.....	24
4.7.2 Diferenciação adipogênica.....	25
4.7.3 Diferenciação condrogênica.....	25

4.8 Análise da diferenciação celular por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).....	26
4.8.1 Extração total de RNA e síntese de cDNA.....	26
4.8.2 Reações de RT-PCR.....	27
4.9 Preparo da associação CTMs-MO+PRP para transplante.....	28
4.10 Grupos experimentais.....	31
4.11 Extrações dentárias, preparo dos alvéolos e instalação dos implantes.....	32
4.12 Radioterapia.....	35
4.13 Eutanásia dos animais.....	36
4.14 Avaliação macroscópica dos espécimes.....	36
4.15 Coloração das lâminas.....	38
4.16 Obtenção das imagens fotomicrográficas.....	39
4.17 Análise histológica e histomorfométricas das amostras.....	39
4.18 Análise estatística dos resultados.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das CTMs-MO de <i>Minipigs BR-1</i>	43
5.2 Avaliação clínica dos espécimes ósseos.....	50
5.3 Avaliação do percentual de implantes perdidos (PIP).....	50
5.4 Análise histológica e histomorfométrica das amostras.....	52
5.4.1 Análise do percentual de contato-osso-implante (COI) e da densidade óssea no interior das roscas (DOIR).....	57
6. DISCUSSÃO.....	63
6.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das CTMs-MO de <i>Minipigs BR-1</i>	63
6.2 Efeitos da RT e uso da associação CTM-MO+PRP na osseointegração de implantes dentários.....	66
7. CONCLUSÕES.....	73
8. ANEXOS.....	75
9. REFERÊNCIAS.....	81
Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD	7-aminoactinomicina D
ALP	Fosfatase alcalina óssea
AP2	Proteína ligante a ácido graxo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cGy	Centigray
COI	Contato osso-implante
COL II	Colágeno tipo II
CT	Células-tronco
CTM	Células-tronco mesenquimais
DMEM	Meio de cultura Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOIR	Densidade do osso no interior das roscas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gy	Gray
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MO	Medula óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIP	Percentual de implantes perdidos
PRP	Plasma rico em plaquetas
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Miniporcões brasileiros (<i>Minipig BR-1</i>).....	20
Figura 2 - Coleta de medula óssea: A) Posição do animal sob anestesia geral; B) Tricotomia da região da crista ilíaca; C) Agulha Tipo Jamshidi; D) Perfuração da cortical óssea; E) Aspiração da medula óssea e F) Aspirado de medula óssea diluído em meio de cultura.....	21
Figura 3 - Figura 3 - A) Adição do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque ao aspirado de medula óssea e meio de cultura; B) Anel de células mononucleares após primeira centrifugação; C) Botão de células mononucleares formado após segunda centrifugação.....	23
Figura 4 - A) Botão de CTMs-MO; B) PRP; C) Associação de CTMs-MO+PRP; D) Porções de CTMs-MO+PRP para preenchimento de cada alvéolo previamente à instalação dos implantes.....	30
Figura 5 - Sequência de procedimentos cirúrgicos. A) Animal sob anestesia geral; B) Aspecto clínico inicial dos dentes pré-molares; C) Aspecto radiográfico inicial; D) Odontosecção sagital; E) Alvéolos frescos; F) Aspecto radiográfico pós-exodontia; G) Implantes recém instalados no lado controle; G1) Transplante do gel de CTMs-MO+PRP; G2) instalação do implante no alvéolo contendo CTMs-MO+PRP; G3) Implantes recém instalados no lado experimental; H) Colocação da membrana osteoprotetora; F) Sutura e J) Aspecto radiográfico final.....	34
Figura 6 - Animal durante sessão de radioterapia com uso de máscara facial termoplástica.....	36
Figura 7 - A) Inclusão do bloco ósseo em resina metilmetacrilato; B) Micrótomo de impacto; C) Vista do bloco após microtomia.....	38

Figura 8 - Imagem digitalizada demonstrando as marcações nos cortes para análise do percentual de contato osso-implante, onde a linha vermelha corresponde à superfície total do implante e a linha verde ao contato osso-implante.....41

Figura 9 - Imagem digitalizada demonstrando as marcações nos cortes para análise da densidade óssea no interior das roscas, onde a marcação vermelha representa a área total no interior da rosca e verde, a área de matriz óssea mineralizada no interior da rosca...41

Figura 10 - Morfologia das CTMs-MO de *Minipigs BR-1* nos aumentos de 40X (A) e 100X (B) 43

Figura 11 - Imunofenotipagem das CTMs-MO de *Minipigs BR-1*. Os histogramas são representativos de um experimento e os valores equivalem à média da porcentagem das células positivas. O controle isotópico está representado em vermelho e o histograma azul indica reatividade com o anticorpo indicado.....47

Figura 12 - Diferenciação das CTMs-MO em osteoblastos (B), adipócitos (D) e condrócitos (F) após 14-21 dias de cultura na presença de fatores de indução, evidenciada respectivamente pelas colorações *Alizarin Red S*, *Oil Red O* e *Alcian Blue*. As setas indicam a matriz mineralizada (B), a presença de vacúolos lipídicos no interior das células (D) e a presença de células cuboidais e lacunas ao redor dos condrócitos jovens (F). As células cultivadas durante o mesmo período em meio sem os fatores de indução a diferenciação, não demonstraram diferenciação espontânea (A, C, E). Aumentos de 100X (A, B) e 400X (C, D, E, F).....48

Figura 13 - Análise da expressão de três marcadores de células tronco mesenquimais de Minipig BR-1 diferenciadas para: adipócitos (AP2), osteoblastos (ALP) e condroblastos (COL II). As diferenciações foram induzidas por 21 dias. Foi extraído RNA e os níveis de mRNAs foram testados por RT-PCR. A expressão de GAPDH foi usado como controle. Os dados foram coletados a partir de 3 culturas de células animais independentes e as reações de RT-PCR foram realizadas em triplicata. As bandas foram quantificadas por densitometria e normalizadas por GAPDH e a razão dos valores do

controle por induzido mostrado ao gráfico ao lado. Teste t de *Student*; * $p < 0,05$ 49

Figura 14 - Exemplos das mandíbulas dissecadas logo após eutanásia dos animais. A) Grupo A (controle/ não irradiado); B) Grupo B (implantes pré-radioterapia); C) Grupo C (implantes pós-radioterapia) 50

Figura 15 – Fotomicrografia com vista panorâmica de implante mostrando fibrointegração. Observa-se tecido conjuntivo ao redor do implante, sem nenhuma evidência de neoformação óssea. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 12,5X.....53

Figura 16 - Fotomicrografia de amostra do grupo C, lado experimental, mostrando ausência de tecido ósseo periimplantar (cor vermelha). Nota-se presença somente de tecido fibroso ao redor do implante (cor azul). Coloração: Azul de *Stevenel* com Alizarina Vermelha. Barra: 100µm.....54

Figura 17 - Fotomicrografia mostrando falha no processo de osseointegração, com ausência de tecido ósseo junto ao implante. Observa-se uma matriz óssea não mineralizada, rica em fibrócitos e fibroblastos, e presença de células multinucleadas (osteoclastos) em atividade (seta) próximo ao osso neoformado. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 100X.....55

Figura 18 - Fotomicrografia mostrando neoformação óssea junto ao implante, característica da osseointegração. Presença de tecido ósseo maduro (TOM), osteócitos (OC), matriz óssea não mineralizada (MONM), linha de osteoblastos (OB) depositando a matriz osteóide (asterisco vermelho) e tecido ósseo jovem recém mineralizado (asterisco preto). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 100X 56

Figura 19 - Fotomicrografia mostrando percentual de COI igual a zero e DOIM maior que zero. Observar presença de rima de osteoblastos (setas vermelhas) ao redor do osso recém mineralizado, indicando atividade de neoformação óssea no interior das roscas do implante, em direção à superfície do implante.....57

Figura 20 - Fotomicrografias de amostras representativas do lado controle dos três grupos estudados. A) Grupo A; B) Grupo B e C) Grupo C.....60

Figura 21 - Fotomicrografias de amostras representativas do lado experimental dos três grupos estudados. A) Grupo A; B) Grupo B e C) Grupo C.....60

Figura 22 - Fotomicrografias de amostras representativas dos lados controle e experimental dos grupos A (A e D respectivamente), B (B e E respectivamente) e C (C e F respectivamente). Coloração: Azul de Toluidina. Barra: 100µm.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores e condições utilizadas para a técnica RT-PCR.....	26
Tabela 2 - Volume em ml de medula óssea (MO) coletado da crista ilíaca de <i>Minipigs BR-1</i> ; número de células mononucleares obtidas; número de células por ml e viabilidade celular após o isolamento celular	44
Tabela 3 - Número de células mononucleares e viabilidade celular no dia do transplante (P_4-P_5).....	45
Tabela 4 - Expressão dos antígenos de superfície celular avaliados por citometria de fluxo.....	46
Tabela 5 - Percentual de implantes perdidos instalados em alvéolos frescos em mandíbula de <i>Minipigs BR-1</i> , avaliados após 90 dias.....	51
Tabela 6 - Valores de p para os lados controle e experimental, na comparação dos grupos em relação ao número de implantes perdidos após 90 dias.....	51
Tabela 7 - Comparação entre os lados controle e experimental, dentro de cada grupo, em relação aos percentuais totais de perda dos implantes.....	52
Tabela 8 - Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p , em relação ao percentual de contato-osso-implante (COI).....	58
Tabela 9 - Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p , em relação à densidade óssea no interior das roscas (DOIR).....	58
Tabela 10 - Valores de p das comparações entre os lados controle e experimental, dentro de cada grupo.....	59

RESUMO

Zanicotti, RTS. *Avaliação da interface osso-implante em mandíbula de miniporcos irradiados e o uso de células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na osseointegração*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço normalmente são tratados por combinação de cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia. Em muitos casos, a reabilitação oral com próteses implanto-suportadas representa a melhor opção para uma recuperação funcional adequada. Entretanto, em pacientes irradiados procedimentos como exodontias e instalações de implantes dentários são fatores de risco ao desenvolvimento de osteorradionecrose. Diversos estudos experimentais têm demonstrado que o uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) associadas a fatores de crescimento como plasma rico em plaquetas (PRP) proporciona melhora no reparo ósseo e na osseointegração, podendo ser considerada uma alternativa viável para defeitos ósseos ou injúria. **Objetivos:** Isolar e caracterizar as CTMs da medula óssea (MO) de miniporcos brasileiros (*Minipigs BR-1*), avaliar a interferência da RT e o efeito da associação de CTMs-MO+PRP no processo de osseointegração de implantes instalados em alvéolos frescos em mandíbulas de miniporcos, por análise histológica e histomorfométrica da interface osso-implante. **Métodos:** CTMs-MO de 12 miniporcos adultos machos foram isoladas da crista ilíaca. Após 21 dias de cultura, o potencial de diferenciação celular foi avaliado por meio de coloração e RT-PCR. O perfil imunofenotípico foi caracterizado por citometria de fluxo. Os animais foram divididos em três grupos: Grupo A (grupo controle, sem RT), Grupo B (implantes instalados 15 dias antes da RT) e Grupo C (implantes instalados três meses após a RT). A dose total de radiação para cada lado da mandíbula foi de 24 Gy, divididos em três doses de 8 Gy com intervalo de 7 dias entre as doses, a qual equivale biologicamente a aproximadamente 56 Gy, com 28 exposições de 2 Gy cada. Quatro implantes de titânio foram instalados nos alvéolos frescos, imediatamente após as extrações dos terceiro e quarto pré-molares, totalizando 48 implantes controles e 48 experimentais (uso de CTM-MO+PRP). Os animais foram eutanasiados 90 dias pós-implantação. Foram analisados o percentual de implantes perdidos (PIP), o contato osso-implante (COI), e a densidade óssea no interior das roscas (DOIR). **Resultados:** A eficiência de isolamento das CTMs-MO foi de 100% e em cultura as células apresentaram morfologia fibroblástica. As células foram positivas para CD90 (88,6%), CD29 (89,8%), CD44 (86,9%) e negativas para CD34 (1,6%), CD45 (1,8%), CD14 (1,8%) e MHC-II (2,7%). As células foram diferenciadas em adipócitos, demonstrado pela presença de vacúolos lipídicos no interior das células; osteoblastos, pela mineralização da matriz extracelular e condrócitos pela presença de lacunas ao redor dos condrócitos jovens. A maior expressão gênica de AP2, ALP e COL II em células induzidas também confirmou o potencial de diferenciação ($p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,031$; respectivamente). Os PIP nos lados controle e experimental foram respectivamente 25,0% e 18,7% no grupo A ($p=0,686$), 31,2% e 25,0% no grupo B ($p=0,686$) e 68,7% e 68,7% no grupo C ($p=1,000$). Na comparação entre os três grupos, o PIP apresentou diferença estatisticamente significativa tanto no lado controle ($p=0,041$) como no experimental

($p=0,047$). Os percentuais de COI nos lados controle e experimental foram respectivamente 39,0 e 27,7 no grupo A ($p=0,110$); 20,9 e 16,7 no grupo B ($p=0,347$) e 16,0 e 7,1 no grupo C ($p=0,310$), com diferença estatística entre os grupos tanto no lado controle ($p=0,033$) quanto no experimental ($p=0,046$). As DOIR nos lados controle e experimental foram respectivamente 46,8 e 36,5 no grupo A ($p=0,247$); 29,3 e 24,1 no grupo B ($p=0,379$) e 21,0 e 11,6 no grupo C ($p=0,421$), porém com diferença estatisticamente significativa entre os três grupos somente no lado controle ($p=0,025$).

Conclusões: As CTMs-MO de *Minipigs BR-1*, obtidas com o protocolo utilizado neste estudo são células-tronco, podendo ser aplicadas em ensaios pré-clínicos na medicina regenerativa. Os resultados mostraram um efeito negativo da radiação ionizante na neoformação óssea periimplantar tanto no grupo B quanto no C. Após a RT a perda de implantes foi três vezes maior que em osso não irradiado. A RT realizada 15 dias após a instalação dos implantes não interferiu na perda de implantes, sugerindo que este seria o melhor momento para reabilitação bucal com implantes dentários. Com a metodologia empregada, o uso da associação CTMs-MO+PRP previamente à instalação de implantes não apresentou efeito positivo significativo na neoformação óssea periimplantar.

Descritores: Radioterapia; Osseointegração; Implantes Dentários; Transplante de Células-Tronco Mesenquimais; Células-Tronco; Plasma Rico em Plaquetas; Miniporcos.

SUMMARY

Zanicotti, RTS. Evaluation of the bone-implant contact in the mandible of irradiated minipigs and the use of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on osseointegration. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Introduction: Patients with head and neck cancer are usually treated by a combination of surgery, radiotherapy (RT) and chemotherapy. In many cases, oral rehabilitation with implant-supported prostheses is the best option for a proper functional recover. However, in irradiated patients procedures as dental extractions and implants are risk factors for developing osteoradionecrosis. Several experimental studies have shown that the use of mesenchymal stem cells (MSCs) associated with growth factors such as platelet-rich plasma (PRP) provides improvement in bone regeneration and osseointegration, being considered an alternative to bone defects or injury. **Objectives:** To isolate and characterize MSCs from bone marrow (BM) of Brazilian minipigs (Minipigs BR-1), to evaluate the effect of RT and of BM-MSCs+PRP in the osseointegration of implants placed in fresh sockets, by histological and histomorphometric analysis of the bone-implant interface. **Methods:** BM-MSCs from 12 adult male minipigs were isolated from the iliac crest. After 21 days of culture, cell differentiation potential was assessed by staining and RT-PCR. The immunophenotypic profile was characterized by flow cytometry. The animals were divided into three groups: Group A (control group, no RT), Group B (implants placement 15 days before RT) and Group C (implants placement three months after RT). The total radiation dose for each side of the mandible was 24 Gy, divided into 3 doses of 8 Gy with a 7 day-interval for each dose, which is biologically equivalent to approximately 56 Gy, with 28 sections of 2 Gy each. Four titanium implants were installed in the alveoli fresh, immediately after the extraction of the third and fourth premolars of each hemimandible, totalling 48 implants on the control side and 48 on the experimental side (using BM-MSCs+PRP). The animals were euthanized 90 days post-implantation. The implant loss rate (ILR), the bone-implant-contact (BIC) and bone density inside the threads (BDIT) were determined in each group. **Results:** The efficiency of the isolation of BM-MSCs was 100%, and in culture, the cells showed fibroblastoid morphology. Cells were positive for CD90 (88.6%), CD29 (89.8%), CD44 (86.9%) and negative for CD34 (1.6%), CD45 (1.8%), CD14 (1.8%) and MHC-II (2.7%). Cells were differentiated into adipocytes, as demonstrated by the presence of lipid vacuoles in the cells, osteoblasts, by mineralization of extracellular matrix and chondrocytes, by the presence of gaps around the young chondrocytes. The higher gene expression of AP2, ALP and COL II at induced cells also confirmed the differentiation potential ($p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.031$; respectively). The ILR in control and experimental sides were respectively 25.0% and 18.7% in group A ($p=0.686$), 31.2% and 25.0% in group B ($p=0.686$) and 68.7% and 68.7% in group C ($p=1.000$), with a statistically significant difference between the three groups at the control side ($p=0.041$) and at the experimental side ($p=0.047$). The percentage of BIC in control and experimental sides were respectively 39.0 and 27.7 in group A ($p=0.110$), 20.9 and 16.7 in group B ($p=0.347$) and 16.0 and 7.1 in group C ($p=0.310$), with statistical significance between the groups at the control side ($p=0.033$) and at the experimental side ($p=0.046$). The

BDIT in experimental and control sides were respectively 46.8 and 36.5 in group A ($p=0.247$), 29.3 and 24.1 in group B ($p=0.379$) and 21.0 and 11.6 in group C ($p=0.421$), with statistical significance between the three groups only at the control side ($p=0.025$).

Conclusions: The BM-MSCs of Minipigs BR-1 obtained with this protocol can be used in pre-clinical regenerative medicine since they are stem cells. The results showed a negative effect of RT in peri-implant bone regeneration in group B and C. The implant loss was three times higher in irradiated bone than in non-irradiated one. The RT performed 15 days after implant placement did not interfere with implant loss, suggesting that this would be the best time for oral rehabilitation with dental implants. With this methodology, the use of BM-MSCs+PRP before the implant placement did not show any significant positive effect on peri-implant bone regeneration.

Descriptors: Radiotherapy; Osseointegration; Dental Implant; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Stem Cell; Platelet-rich Plasma; Minipigs.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Osseointegração de implantes dentários

Os implantes dentários têm revolucionado o tratamento odontológico desde a sua introdução por Brånemark em 1969, que viabilizou esta técnica em regiões edêntulas (Albrektsson; Lekholm, 1989), tornando os processos de regeneração óssea e osseointegração alvos de vários estudos experimentais. Na implantodontia um dos fenômenos mais intensamente investigado é a osseointegração, objetivando sempre a aceleração e/ou incremento deste processo. Os implantes osseointegráveis são uma alternativa efetiva para reabilitação da função mastigatória, fonação e estética em casos de perda dentária, uma vez que substituem as raízes dentárias, permitindo a instalação de uma prótese.

O termo osseointegração foi criado por Brånemark et al. (1977) para descrever o contato direto entre osso vivo e um implante de titânio, sem a interposição de camadas de tecido fibroso. Em 1998, Brånemark sugeriu que a osseointegração é a coexistência estrutural e funcional entre os tecidos biológicos e materiais sintéticos, promovendo resultados clínicos duradouros, sem que haja uma resposta de rejeição ou lise óssea ao redor do implante, por parte do organismo.

A osseointegração é uma definição histológica, observada por meio de microscopia óptica (Albrektsson et al., 1981) e, apenas parcialmente, uma definição clínica e radiográfica (Albrektsson et al., 1986). Estudos experimentais sobre osseointegração devem incluir uma avaliação quantitativa da porcentagem de contato direto entre o osso e o substrato implantado (Albrektsson et al., 1986), devendo apresentar uma média de 70% de contato após seis meses da instalação (Paolantonio et al., 2001) e de 90% ou mais após um ano (Albrektsson; Sennerby, 1990). Segundo alguns autores, o termo é a expressão do potencial de regeneração básica e inespecífica do tecido ósseo frente a um material biocompatível (Albrektsson et al., 1986; Linder 1989; Johansson; Albrektsson, 1991).

Um biomaterial implantado no tecido ósseo pode apresentar dois tipos de integração: (1) osseointegração direta ou verdadeira, quando se estabelece um contato direto entre o tecido ósseo e a superfície do material implantado; e (2) indireta ou fibro-

óssea, quando uma cápsula fibrosa se interpõe entre o tecido ósseo e a superfície do implante (LeGeros; Craig, 1993). Quanto maior a quantidade de tecido ósseo em contato com as roscas do implante, maior é o sucesso da fixação do implante. A integração fibro-óssea (fibrointegração) é aceitável somente nos estágios iniciais de cicatrização pós implantação, sendo considerada um fator desfavorável à estabilidade dos implantes, a longo prazo, uma vez que as fibras colágenas que permanecem interpostas entre o osso e o implante fixam-se ao tecido ósseo, mas não à superfície do implante, o que leva à perda do implante.

O processo de cicatrização do tecido ósseo após a instalação de um implante pode ser dividido basicamente em três etapas: osteocondução, neoformação e remodelação óssea. Logo após a instalação do implante, inicia-se a reparação da ferida cirúrgica, por meio da formação do coágulo, processo chamado de osteocondução (Davies, 1998). Por volta do quarto dia, células mesenquimais indiferenciadas migram em direção à superfície do implante, por meio do tecido conjuntivo frouxo formado, e se diferenciam em osteoblastos, iniciando o processo de osteogênese (Albrektsson; Johansson, 2001). Uma rede de fibrina aderida à superfície do implante é formada, permitindo a migração das células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células linfóides. Durante a migração destas células, a rede de fibrina se retrai, acelerando o processo de diferenciação celular. Quando ocorre a fibrinólise do coágulo, forma-se um tecido conjuntivo frouxo, o qual servirá de guia para a angiogênese. Por volta do sétimo dia, as células mesenquimais em diferenciação secretam matriz orgânica sem colágeno, onde ocorrerá a deposição de fosfato de cálcio e aposição de fibras colágenas na interface formada. Ocorre então a calcificação da porção colágena, tanto das fibras quanto das regiões entre as fibras. No processo de neoformação óssea, a porção colágena do osso fica separada da superfície do implante por uma camada de tecido calcificado livre de colágeno. Essa camada, de aproximadamente 0,5 μm de espessura, chamada de linha de cimento, é a mesma observada na interface entre o osso pré-existente e o osso neoformado. Áreas de neoformação óssea poderão ser observadas ao redor dos vasos sanguíneos sobre a superfície óssea (osteogênese à distância), e sobre a superfície do implante (osteogênese de contato) (Davies, 1998; Brunski et al., 2000). A neoformação óssea intensifica-se gradualmente a partir da segunda semana, sendo que, na sexta semana já é possível observar *osteons* primários e secundários. Entre a oitava e a décima segunda semanas já se observam sinais de remodelação óssea,

importante para a estabilização dos implantes (Brånemark et al., 1977; Davies, 1998; Berglundh et al., 2003).

1.2 Instalação de implantes em alvéolo frescos

Os implantes dentários podem ser instalados imediatamente após a exodontia, nos alvéolos frescos, sem comprometimento da osseointegração e com manutenção da morfologia tecidual. A instalação de implantes pela técnica imediata elimina o período de reparação do alvéolo, mantém altura e largura óssea alveolar, diminuindo o período para instalação da prótese (Barzilay, 1993).

Barzilay (1993) classificou os implantes imediatos em três tipos: Tipo I - quando o alvéolo tem diâmetro menor que o implante colocado; o implante apresenta-se em íntimo contato com osso em toda a superfície. Tipo II - quando a anatomia dos alvéolos após a exodontia apresenta um espaço entre o alvéolo e o implante, podendo existir espaço na interface da porção cervical do implante, enquanto que a região apical encontra-se intimamente em contato com o osso alveolar. Tipo III - existe espaço em toda margem lateral do implante.

Paolantonio et al. (2001) avaliaram a osseointegração de implantes imediatos em humanos, clínica e histologicamente. Os implantes do grupo controle foram instalados em sítios preparados e os implantes testados em alvéolos imediatamente após a exodontia, sem a utilização de enxertos e/ou membranas. Após seis meses, os pacientes foram submetidos à segunda cirurgia e os sítios foram trefinados para obtenção das peças. A média de contato ósseo-implante foi de 70,6% para o grupo controle, e 67,9% para o grupo da implantação imediata, sem diferenças significantes entre os dois grupos. O estudo mostrou que quando implantes imediatos são colocados sem o uso de barreiras ou materiais de enxerto, com *gaps* de alvéolos de extração não maiores do que 2 mm, o índice de osseointegração não difere dos implantes colocados em osso após reparo alveolar.

Barzilay et al. (1996) instalaram implantes em alvéolos imediatamente após a exodontia em diferentes regiões da maxila em mandíbula em macacos. Todos os implantes mostraram evidência clínica e histológicas de osseointegração nas diferentes localizações anatômicas. Os autores alertam que o importante não é somente a porcentagem de área onde ocorreu osseointegração, mas sim a qualidade do osso junto

ao implante e as forças oclusais que estes implantes receberão.

1.3 Efeitos da radioterapia na osseointegração

Radioterapia (RT) é a modalidade terapêutica que utiliza radiações ionizantes para destruição das células neoplásicas, visando a redução ou desaparecimento das células malignas. Contudo, esta técnica não possui a capacidade de diferenciar células normais das células neoplásicas, o que a torna tóxica para o organismo (Savajoli et al., 1999). Na região da cabeça e pescoço a RT pode provocar nos tecidos afetados alterações reversíveis e irreversíveis, dependendo da dose de irradiação, tempo de tratamento, dose de distribuição e uso concomitante de outras terapias (Celik et al., 2002). A mucosite, hipossalivação, perda do paladar, cáries por radiação, trismo e osteorradionecrose são alguns dos efeitos colaterais comuns da RT realizada na região de cabeça e pescoço (Vissink et al., 2003).

Em muitos casos, a reabilitação oral com próteses implanto-suportadas representa a melhor opção para a recuperação adequada pós ressecção de um tumor na região de cabeça e pescoço, principalmente quando o tumor envolve os ossos do complexo maxilo-mandibular. Além disso, o ressecamento da mucosa bucal provocado pela diminuição do fluxo salivar torna-a altamente irritável, contraindicando o uso de próteses convencionais muco-suportadas. Vários fatores influenciam a osseointegração de implantes em pacientes oncológicos: dose de irradiação, tempo de intervalo entre a RT e a instalação dos implantes, material e tratamento de superfície do implante e sequência dos procedimentos (Brogniez et al., 2000).

A osteorradionecrose constitui a complicação tardia mais séria do tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço, principalmente quando afeta a mandíbula, por esta apresentar alta densidade óssea e pouca vascularização sanguínea (Gal et al., 2000; Schiodt; Hermund, 2002). Define-se tipicamente como uma osteonecrose provocada pela radiação ionizante (Marx; Johnson, 1987). Clinicamente é a perda da mucosa de revestimento ou do tecido cutâneo com exposição do tecido ósseo necrótico por pelo menos três meses, em uma área irradiada previamente (Jereczek-Fossa et al., 2002). Geralmente acompanhada de fístulas orais e/ou cutâneas, trismo, drenagem de secreção purulenta, sequestração tardia, algia, desconforto, dificuldades mastigatórias e, por vezes, deformidade permanente. O diagnóstico é estabelecido por meio de evidencia

clínica e radiográfica de necrose óssea após irradiação, que não esta relacionada à recorrência do tumor (Curi; Kowalski, 2003).

A radiação ionizante na região óssea promove um estreitamento dos canais vasculares, processo chamado de endarterite obliterante, o que promove redução da vascularização, da tensão de oxigênio tecidual e do número de células, produzindo uma área com baixa capacidade de reparo e cicatrização (Marx; Johnson, 1987; Rothwell, 1987; Schiodt; Hermund, 2002). Outra teoria que explica a osteorradionecrose é a teoria que a radiação induz fibrose (Delanian; Lefaix, 2004). Esta teoria propõe que o dano ao osso é causado por fibrose induzida pela radiação ionizante. As células no osso são danificadas como resultado de inflamação aguda, produção de radicais livres e ativação de fibroblastos por uma série de fatores de crescimento. Estas alterações tornam o osso susceptível ao desenvolvimento da osteorradionecrose quando submetido a procedimentos como exodontias, instalação de implantes dentários, doença periodontal grave, infecções endodônticas e trauma (Rothwell, 1987; Jereczek-Fossa; Orechia, 2002).

A estenose da artéria alveolar inferior induzida pela RT é um exemplo de alteração vascular que afeta diretamente a instalação de implantes no osso mandibular. Essa estenose pode ser classificada de acordo com o grau de comprometimento da luz do vaso. Assim, quando há redução maior do que 50%, a estenose é classificada como severa e, até 50%, como moderada, sendo que a estenose severa pode levar à osteorradionecrose espontânea (McGregor; Macdonal, 1995).

A incidência de osteorradionecrose varia amplamente na literatura (0 - 74%), uma vez que não há uma padronização dos fatores avaliados. A comparação das diferentes incidências publicadas é muito difícil devido à variação de uma série de fatores de risco como localização e estadiamento do tumor, tipo de cirurgia para ressecção do tumor, técnicas de radiação e as dosagens aplicadas, estado dos dentes antes da RT, procedimentos dentários realizados, dentre outros. Apesar disso, os avanços tecnológicos nos aparelhos de RT e a melhoria das técnicas cirúrgicas têm alterado a incidência de osteorradionecrose, com média atualmente variando de 5 a 10% (Niewald et al., 2013).

O regime convencional da RT para carcinomas epidermóides na região de cabeça e pescoço é de 180 a 200 cGy por fração/dia por um período de 5 a 6 semanas, com uma dose total de 60 a 65 Gy (Berger; Kilroy, 2004). De acordo com Thom et al.

(2000), 74% dos casos de osteorradionecrose ocorrem nos primeiros três anos após a RT, com maior frequência em pacientes que receberam doses superiores a 60 Gy, embora os pacientes tenham potencial de desenvolvê-la por tempo indefinido (Jereczek-Fossa; Orecchia, 2002).

O primeiro trabalho experimental que analisou histologicamente os efeitos da RT na osseointegração de implantes foi publicado por Schweigr (1989), quando ele observou que apenas 50% dos implantes instalados em mandíbulas irradiadas de cães sofreram osseointegração efetivamente. A radiação ionizante afeta substâncias ósseas mineralizadas, interferindo diretamente na osseointegração de implantes dentários, o qual apresenta um risco de insucesso duas a três vezes maior que em osso não irradiado (Ihde et al., 2009). Estudos revelam efeito negativo da RT na osseointegração e na estabilidade de implantes osseointegráveis em osso previamente irradiado, com risco aumentado de perda primária do implante e do desenvolvimento de osteorradionecrose (Brogniez et al., 2000; Verdoch et al., 2008).

Asikainen et al. (1998) realizaram um estudo experimental com 15 cães da raça *beagle* com o objetivo de avaliar o efeito da RT na osseointegração de implantes dentários. Foram extraídos os dois pré-molares de cada lado da mandíbula de cada cão, e após dois meses os animais foram submetidos à RT apenas de um lado da mandíbula. Os animais foram divididos em três grupos diferentes, de acordo com o total de radiação ionizante recebida: 40, 50 e 60 Gy. Após dois meses da última sessão de RT foram instalados dois implantes de cada lado, e confeccionada uma ponte fixa sobre os implantes, totalizando 60 implantes. Seis meses após a instalação dos implantes, os cães foram sacrificados e a interface osso-implante analisada histologicamente. Os resultados indicaram boa integração de todos os implantes no grupo submetido a 40 Gy de radiação. No grupo de 50 Gy, um implante foi perdido durante os seis meses e quatro mostraram clinicamente mobilidade e histologicamente, pobre integração óssea. No grupo submetido a 60 Gy, todos os implantes do lado irradiado sofreram rápida reabsorção óssea, não ocorrendo a osseointegração. Os autores sugerem que o tempo da colocação dos implantes após a RT seja maior, de aproximadamente 12 meses, para tentar minimizar os efeitos da radiação no processo de osseointegração.

Renou et al. (2001) realizaram um estudo experimental para avaliar o processo de osseointegração sob condições de irradiação corporal total. Sob anestesia intraperitoneal, 20 ratos *Wistar* foram irradiados com uma dose única de 70 Gy. Quatro

dias após a irradiação, um implante de titânio foi colocado na tíbia esquerda de cada rato. Terapia antibiótica foi administrada diariamente após implantação, para prevenir a infecção por radiação. Quatorze dias após a instalação do implante, os animais foram sacrificados e as tíbias ressecadas, radiografadas e analisadas histologicamente. Os resultados mostraram osteogênese prejudicada e ausência de osseointegração. A medula óssea periimplantar revelou uma perda de tecidos hematopoéticos com a ocorrência de sinais de hemorragia e necrose. Foi observada formação de osso reativo trabecular no compartimento medular. Mensurações histomorfométricas do percentual de osso em contato direto com a superfície do implante mostraram uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$) entre o grupo controle ($69 \pm 10\%$) e o grupo experimental (0%). Os autores citaram ainda que estes resultados ocorreram devido a uma ação direta da irradiação corporal total sobre células osteogênicas precursoras, o que prejudicaria a formação óssea responsável pela osseointegração periimplantar neste modelo experimental.

Em estudo retrospectivo, Moy et al. (2005) avaliaram 4.680 implantes instalados em 1140 pacientes. Os autores relataram que a RT é um dos principais motivos de insucesso da osseointegração de implantes, com índice de falha de 31,8%, resultado pior do que os grupos de pacientes diabéticos ou fumantes. De acordo com Alsaadi et al. (2008), a RT aumenta de modo significativo o insucesso da osseointegração, uma vez que prejudica a qualidade óssea e o suprimento sanguíneo local.

1.4 Terapia celular e células-tronco mesenquimais

A terapia celular tem como princípio restaurar a função de um órgão ou tecido, transplantando novas células para substituir as células perdidas pela doença, ou substituir células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético (Kimelman et al., 2007). A base para qualquer construção tecidual decorrente da engenharia de tecidos é a fonte de células que será utilizada para iniciar o novo crescimento tecidual (Gomillion; Burg, 2006).

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de autorrenovação, bem como a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares (Krause et al., 2001; Melton; Cowen, 2009). São classificadas pelo seu potencial de diferenciação como totipotentes, as quais são capazes de formar todos os tipos celulares

incluindo os anexos embrionários; pluripotentes, capazes de dar origem a todos os tipos de células do embrião, exceto os anexos embrionários e multipotentes com capacidade de diferenciação limitada, podendo dar origem a um subconjunto de linhagens de células (Carvalho; Goldenberg, 2012).

Dependendo da sua origem, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias, adultas e pluripotentes induzidas. As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto, podem proliferar indefinidamente e preservar sua pluripotência, porém podem dar origem a teratomas e teratocarcinomas, além dos problemas éticos envolvidos (Carvalho; Goldenberg, 2012). As células-tronco pluripotentes induzidas são geradas por meio da reprogramação de células diferenciadas e passam a se comportar como células pluripotentes (Takahashi; Yamanaka, 2006). As células-tronco adultas estão presentes em diversos tecidos do organismo adulto e participam do reparo do tecido danificado. São multipotentes, pois possuem uma menor capacidade de diferenciação e proliferação comparativamente às embrionárias, porém são mais seguras para a utilização em pacientes, uma vez que a possibilidade de formação de tumores é remota. Além disso, as células-tronco adultas de origem autóloga podem ser usadas descartando a necessidade de uso de imunossupressores (Strauer, 2008), representando, desta forma, uma nova alternativa no tratamento de diversas doenças (Orlic et al., 2002).

Os tecidos mesenquimais apresentam células multipotentes conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais podem ser facilmente isoladas apresentam capacidade de propagação em cultura e são pouco imunogênicas, podendo ser, teoricamente, empregadas em transplantes alógenos (Caplan, 2009; Bydlowski et al., 2009). Para que uma célula seja definida e caracterizada como CTM, esta deve ser capaz de aderir à superfície plástica quando em cultura, apresentar capacidade de diferenciação celular em linhagens como osteoblastos, adipócitos e condrócitos quando estimuladas e expressar marcadores de superfície específicos para células mesenquimais (Dominici et al., 2006).

As CTMs representam uma população de células-tronco adultas, com localização perivascular (da Silva Meirelles et al., 2008), que podem ser isoladas, expandidas em cultura e caracterizadas *in vitro* e *in vivo* (Pittenger; Martin, 2004; Rebelatto et al., 2008). Para que houvesse uma uniformidade na caracterização das CTMs, o Comitê de Células-Tronco Teciduais e Mesenquimais da Sociedade Internacional para Terapia

Celular propôs os critérios mínimos para definir as células estromais mesenquimais multipotentes humanas, os quais englobam um conjunto de características morfológicas, fenotípicas e funcionais (Dominici et al., 2006). Desta forma, as CTMs devem ser aderentes ao frasco plástico, apresentar morfologia alongada semelhantes aos fibroblastos e devem ser positivas para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e MHC-II. Funcionalmente devem ter o potencial de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares: adipócitos, condrócitos e osteoblastos, porém alguns trabalhos demonstraram a diferenciação destas células também em tenócitos, miotubos, astrócitos e células estromais hematopoéticas, entre outros (Pittenger et al., 1999; Kang et al., 2006; Wang et al., 2006; Antonitsis et al., 2007).

As principais funções das CTMs são a manutenção e a renovação dos tecidos mesenquimais adultos (Caplan, 2009). Estas células podem ser utilizadas terapeuticamente uma vez que secretam fatores bioativos que protegem e reparam o tecido danificado, além dos efeitos antiapoptóticos, inibitórios da cicatriz, estimuladores da angiogênese e mitogênicos para células progenitoras intrínsecas do tecido (Caplan, 2006). Além disso, são células pouco imunogênicas por apresentarem baixa expressão de antígenos MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I, ausência de expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40 (Pittenger; Martin, 2004). São células imunossupressoras, suprimindo a função de várias células do sistema imunológico *in vitro*, incluindo células T (Di Nicola et al., 2002; Le Blanc et al., 2007), células B (Corcione et al., 2006), células *natural killer* (Spaggiari et al., 2006) e células apresentadoras de antígenos (Nauta et al., 2006).

As CTMs podem ser isoladas de diversas fontes incluindo a medula óssea (Orlic et al., 2002), o tecido adiposo (Zuk et al., 2002), a derme (Crigler et al., 2007), o sangue (Villaron et al., 2004), o osso trabecular (Nöth et al., 2002), o cordão umbilical humano (Romanov et al., 2003), o sangue de cordão umbilical humano (Lee et al., 2004), os pulmões (Sabatini et al., 2005), a polpa dentária e o ligamento periodontal (Shi et al., 2005), sugerindo que estas células são ampla e diversamente distribuídas *in vivo*.

O uso CTMs originárias da medula óssea (CTMs-MO) em diferentes estudos tem fornecido resultados animadores no aspecto regenerativo (Strauer; Kornowski, 2003). Apesar da sua baixa frequência no aspirado medular, aproximadamente 0,05% da fração celular (Strauer; Kornowski, 2003), as CTMs podem ser facilmente obtidas e

apresentam grande potencial de proliferação e diferenciação *in vitro*, tornando-as atrativas para o uso terapêutico *in vivo* (Javazon et al., 2004). Diversos estudos experimentais têm demonstrado que o uso de CTMs, associado ou não a biomateriais e a fatores de crescimento, proporciona melhora no reparo ósseo e na osseointegração de implantes dentários, podendo ser considerada uma alternativa viável para defeitos ósseos ou injúria (Ito et al., 2006; Pieri et al., 2008; Yamada et al., 2008; Pieri et al., 2009).

1.5 Plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um coágulo de fibrina, rico em plaquetas, as quais liberam até trinta fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), importantes no reparo ósseo (Marx et al., 1998). O PDGF é o fator de crescimento principal que atua na migração e proliferação das CTMs (Gruber et al., 2004). O TGF- β estimula a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e inibe a diferenciação dos adipócitos (Mehta; Watson, 2008). O VEGF induz a proliferação e vascularização das células endoteliais (Boyapati; Wang, 2006).

Marx et al., (1998) demonstraram que o PRP adicionado ao enxerto acelera a consolidação óssea, promovendo uma mineralização na metade do tempo, além de uma melhora de 15% a 30% na densidade do osso trabecular. Marx (2004) atribuiu esses efeitos à presença de TGF- β 1 (Fator de crescimento transformador beta 1) e TGF- β 2 (Fator de crescimento transformador beta 2) sugerindo que células da medula óssea possuem receptores para estes fatores. Estudos mostram que a utilização do PRP associado à instalação de implantes dentários promove uma reação nas moléculas de adesão na interface osso-implante, favorecendo a união das células a proteínas da matriz extracelular, tais quais colágeno tipo I, osteopontina e fibronectina (Schlegel et al., 2003; Zechner et al., 2003). A presença de PRP afeta a resposta óssea periimplantar de modo a aumentar o volume ósseo (Fontana et al., 2004) e melhorar o grau de maturidade óssea (Kim et al., 2002).

Apesar deste raciocínio atraente, existem muita controvérsia em relação ao efeito positivo do PRP na neoformação óssea periimplantar. Alguns autores analisaram a eficácia do PRP na osseointegração de implantes dentários em estudos experimentais e

demonstraram por análise histomorfométricas que não houve diferença significativa na neoformação óssea na interface osso-implante quando comparado ao lado controle (Froum et al., 2002; Garcia et al., 2010). Outros investigadores demonstraram falha na neoformação óssea quando é utilizado o PRP, gerando conflito com o seu efeito clínico na regeneração óssea (Arnoczky et al., 2011; Balaguer et al., 2010; Giovanini et al., 2010 e Giovanini et al., 2011).

Ocaña (2010), realizou um estudo experimental em coelhos de modo a determinar o quanto a irradiação pode prejudicar a formação da interface osso-implante, além de mensurar o quanto a utilização do PRP pode modificar a osseointegração. Foram utilizados 18 coelhos divididos em três grupos: Grupo I, implantes instalados em osso não irradiado; Grupo II, implantes instalados em osso irradiado; Grupo III, implantes instalados em osso irradiado com uso do PRP. Todos os implantes foram instalados em epífise proximal de ambas as tíbias, que foram irradiadas 40 dias antes (1.727cGy). Os animais foram eutanasiados 40 dias após a instalação dos implantes sendo realizada análise histomorfométrica. Foram investigadas a extensão do contato osso-implante e a área de osso neoformado entre as espiras. Para ambos os parâmetros a diferença foi estatisticamente significativa e favorável ao Grupo III em comparação com o Grupo II: 31,7% x 25,9% para contato osso-implante e 33,4% x 25,1% para área de neoformação óssea. Os índices para o Grupo I foram 57,8% x 41,3% respectivamente. O presente estudo aponta para a possibilidade de realização de implante em osso irradiado, além do efeito positivo do PRP no osso irradiado, com aceleração do processo de osseointegração, porém não o suficiente para que os resultados sejam semelhantes aos obtidos pelo grupo controle.

Giovanini et al. (2010) realizaram um estudo experimental em calvária de coelhos para avaliar o efeito do PRP na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de coelhos, tratados com enxerto ósseo autógeno, enxerto ósseo autógeno com PRP e com apenas PRP. Os autores observaram maior quantidade de tecido de granulação e de áreas de tecido medular nos grupos tratados com PRP. A utilização do PRP neste estudo impediu a deposição de tecido ósseo mineralizado, assim como aumentou a expressão de colágeno tipo III e tipo I, além de promover um efeito trombogênico.

1.6 Estudos com células-tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na regeneração óssea

Niemeyer *et al.* (2010) realizaram um estudo experimental com ovelhas comparando o potencial osteogênico de CTMs-MO e do tecido adiposo, e a influência do PRP nestas células em reparo ósseo de defeitos críticos. Os autores verificaram que o grupo tratado com CTMs-MO apresentou potencial osteogênico superior ao grupo tratado com CTMs derivadas do tecido adiposo, mas que este efeito foi parcialmente compensado com a adição de PRP à estas células. Os autores também verificaram histologicamente que o osso formado no grupo tratado com CTMs derivadas de tecido adiposo apresentou células semelhantes à adipócitos, com vacúolos intracelulares, indicando que as células mesenquimais indiferenciadas derivadas de tecido adiposo diferenciam-se espontaneamente em adipócitos, quando não são tratadas com fatores osteoindutores exógenos, enquanto que células mesenquimais isoladas da medula óssea diferenciam-se em tecido ósseo sem a necessidade de fatores de crescimento adicionais.

Com o objetivo de melhorar a vascularização do tecido ósseo e promover a regeneração tecidual, Man et al. (2012) testaram *in vitro* e *in vivo* a hipótese de que a mistura de PRP e CTMs derivadas de tecido adiposo em microesferas de alginato apresentam um potencial osteogênico e angiogênico. Duas observações interessantes foram feitas neste estudo. Em primeiro lugar, demonstrou-se que o PRP mantém a viabilidade das células-tronco, além de promover a migração celular. Em segundo lugar, os experimentos *in vivo* demonstraram a presença de uma rede de vasos sanguíneos dentro das microesferas contendo PRP a 10% e 15% + CTMs derivadas do tecido adiposo, associado a um aumento significativo da mineralização.

Zhang et al. (2012) realizaram um estudo *in vivo* com ratos, testando a hipótese de que a mistura de CTMs-MO com cola de fibrina seria eficaz para reconstruir o osso alveolar. Os modelos animais de defeitos traumáticos ósseos alveolares foram estabelecidos bilateralmente na maxila de 15 ratos, que foram aleatoriamente divididos em três grupos. A mistura CTMs-MO com cola de fibrina na forma de gel foi transplantada em cinco ratos do grupo tratado. Micro tomografia computadorizadas e análises histológicas foram realizadas para verificação de osso neoformado. A quantidade de osso novo formado no grupo tratado foi significativamente maior do que

no controle, sugerindo que a presença desta associação é eficaz na reparação de defeitos ósseos alveolares.

1.7 Suínos e miniporcoss como modelo experimental

Apesar dos experimentos pré-clínicos realizados em pequenos animais proporcionarem um potencial terapêutico para os ensaios clínicos, existem diferenças fundamentais entre o pequeno animal e o homem. Estudos em animais de grande porte são um pré-requisito para validar a eficácia de novas terapias em seres humanos (Ishikawa et al., 2012). Dentre as várias espécies de grande porte utilizadas em experimentação biomédica destaca-se o porco (*Sus scropha*). Estão hoje amplamente estabelecidas na literatura as semelhanças entre a anatomia, fisiologia e fisiopatologia dos suínos e o homem (Bustad, 1965).

A restrição do uso de suínos em estudos experimentais se deu à elevada capacidade de conversão alimentar com consequente ganho de peso desses animais, podendo atingir 150 quilogramas de peso em 6 meses de vida. Essa característica fisiológica da espécie dificultava o uso de animais adultos e limitava planejamento de experimentos em longo prazo, além de que a utilização de animais muito jovens (leitões desmamados) induz a resultados não comparáveis com a fisiologia de humanos adulto (Mariano, 2003).

As limitações descritas acima levaram cientistas a desenvolver colônias de suínos com dimensões menores, compatíveis com a utilização dos mesmos em laboratório, facilitando assim o emprego destes animais como modelo de experimentação em diversas áreas de pesquisa médico-biológica. Esses animais foram denominados de miniporcoss (*minipigs*) ou suínos miniatura (*miniature pigs*), apesar de não apresentarem nanismo (Mariano, 2003).

A raça de miniporcoss brasileiros *Minipig BR1*, foi iniciada em 1997 pela Minipig Empresa e Desenvolvimento LTDA (São Paulo, Brasil), com o objetivo de estabelecer uma colônia de miniporcoss a serem utilizados em experimentação por pesquisadores brasileiros, embora ainda existam poucos trabalhos experimentais que utilizam como modelo animal o *Minipig BR-1*. Atualmente a empresa apresenta uma seleção de linhagens homogêneas quanto ao peso corpóreo, teor de gordura, pelagem, cor e características de aprumo (Mariano, 2003). Miniporcoss brasileiros adultos, com média

de 18 meses, medem e pesam aproximadamente um quarto do tamanho e volume dos suínos, viabilizando pesquisas com animais adultos.

Oltramari et al. (2007) caracterizaram o desenvolvimento das estruturas orais da espécie *Minipig BR-1*, detalhando a cronologia de erupção dentário destes animais dos 3 aos 15 meses de idade. Considerando as estruturais orais, presença dos dentes e erupção dentária, os autores mostraram que estes animais são viáveis para uso em pesquisas odontológicas, e que não apresentam diferenças em relação a outras espécies de miniporcos.

O isolamento, a cultura e a caracterização fenotípica de CTMs-MO de diferentes espécies de miniporcos já foram previamente descritas (Ringe et al., 2002; Chang et al., 2003; Guo et al., 2009). No entanto, ainda não há nenhum trabalho semelhante com a única espécie de miniporcos brasileiros.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer na região de cabeça e pescoço é comumente tratado por combinação de cirurgia, RT e quimioterapia. Em muitos casos, a reabilitação oral com próteses implanto-suportadas representam a melhor opção para uma recuperação funcional adequada. Entretanto, procedimentos cirúrgicos como exodontias e instalações de implantes são fatores de risco ao desenvolvimento de osteorradionecrose, principalmente no osso mandibular.

O ineditismo do trabalho reside no fato de ser um estudo experimental, *in vivo*, o qual avalia microscopicamente a região periimplantar em implantes instalados na mandíbula de miniporcos, imediatamente após a exodontia. Na maioria dos trabalhos publicados os implantes são instalados em ossos extra-orais, como tíbia ou calota craniana. O presente estudo procurou reproduzir a realidade de pacientes oncológicos, que já foram ou que serão submetidos à RT na região de cabeça e pescoço, buscando estabelecer o melhor momento para instalação de implantes dentários nestes pacientes.

Outro fator inédito testado no presente estudo foi o uso da associação de CTMs-MO+PRP para preenchimento do alvéolo previamente à instalação do implante, como alternativa de melhorar a osseointegração.

Os resultados deste estudo fornecerão conhecimento científico, baseado em evidências, do processo de osseointegração pré e pós-RT, além do efeito da CTM-MO+PRP na osseointegração de implantes dentários.

O uso de CTMs-MO+PRP para preenchimento do alvéolo pós exodontia e juntamente à instalação de implantes de titânio em pacientes que serão, ou que já foram submetidos à RT, pode ser uma alternativa que favoreça a neoformação óssea periimplantar em pacientes oncológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a interferência da radiação ionizante e o uso das CTMs-MO+PRP no processo de osseointegração de implantes dentários instalados em alvéolos frescos em mandíbulas de miniporcos, por análise histológica e histomorfométrica da interface osso-implante.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar as CTMs-MO de miniporcos brasileiros (*Minipigs BR-1*);
- Testar efeito da radiação ionizante na osseointegração de implantes dentários em mandíbula de miniporcos.
- Testar o efeito osteogênico da associação CTMs-MO+PRP na osseointegração de implantes dentários em mandíbula de miniporcos.

4 MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa experimental de acordo com a Lei nº 11794/2008 da Constituição Federal, a qual regulamenta e estabelece os “Procedimentos para o uso científico de animais.”

O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Positivo – CUA-UP (protocolo 001/2009), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner (protocolo PP nº 1978) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (nº 1235/09) (APÊNDICE).

4.1 Animais

Foram utilizados 12 miniporcos adultos da raça *Minipig BR1* (Minipig Empresa e Desenvolvimento LTDA, São Paulo, Brasil), todos do sexo masculino, castrados, com peso entre 38 e 50 quilogramas e com idade variando de 14 a 18 meses (Figura 1). Os animais foram mantidos durante todo o experimento no Biotério da Universidade Positivo, sob as mesmas condições, em baias pré-moldadas, com luz e temperatura controladas, e condições de higiene adequadas.

Cada animal recebia diariamente 600 gramas da ração Presuntina Pró (Purina, Brasil), dividida em duas porções, e água *ad libitum*. Toda a colônia de Minipigs BR-1 foi submetida a rigoroso esquema de controle sanitário sendo sistematicamente vacinada contra Leptospirose, Erisipela Suína, Parvovirose, Rinite Atrófica e Pneumonia Enzoótica dos suínos e, periodicamente, tratada com medicamentos para a prevenção de ecto e endoparasitos.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Técnica Operatória da Universidade Positivo, sob orientação da médica veterinária, Professora Doutora Maria Fernanda Torres, responsável pelo Biotério desta Universidade.

Figura 1 - Miniporcos brasileiros (*Minipig BR-1*)

4.2 Técnica anestésica e controle da dor pós-operatória

Para os procedimentos de coleta de MO e para a realização da RT os animais receberam indução anestésica com a associação, via intramuscular, de 10 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Syntec, Brasil) e 3 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Vetbrans, Brasil), seguida da administração endovenosa de 5 mg/Kg de Tiopental Sódico 5% (Cristália, Brasil).

Para as extrações dentárias e instalação dos implantes, os animais receberam a mesma indução anestésica e para a manutenção da anestesia foi utilizado isoflurano inalatório (Cristália, Brasil). Durante a cirurgia, os animais permaneceram sob intubação orotraqueal.

Os animais receberam em todos os procedimentos cirúrgicos cuidados pós-operatórios com 3 mg/Kg de morfina (Cristália, Brasil) por via subcutânea, a cada 12 horas, durante 3 dias, além de Kinetomax (Bayer, Brasil) em dose única por via intramuscular (3 mL para cada 40 kg de peso) para minimizar a dor e o risco de infecção. Os animais foram observados com relação ao comportamento, ingestão de água e ração, por pessoa qualificada e autorizada a acionar atendimento médico-veterinário caso fosse necessário.

4.3 Coleta da medula óssea

Amostra da MO de cada animal foi coletada da crista ilíaca, sob anestesia geral, utilizando-se agulha para biópsia óssea tipo Jamishidi (Raiomedic, PR, Brasil). Uma seringa descartável de 20 mL contendo 0,5 mL de 100.000 UI de heparina sódica (Cristália, Brasil) foi acoplada à agulha e cerca de 40 mL de aspirado de MO foi coletado e adicionada ao meio de cultura DMEM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) contendo 4 mL de heparina 100.000 UI (Figura 2). O material foi levado ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para processamento.

Figura 2 - Coleta de medula óssea: A) Posição do animal sob anestesia geral; B) Tricotomia da região da crista ilíaca; C) Agulha Tipo Jamishidi; D) Perfuração da cortical óssea; E) Aspiração da medula óssea e F) Aspirado de medula óssea diluído em meio de cultura

4.4 Isolamento das células mononucleares e cultura das células mesenquimais

O aspirado de MO foi diluído em meio de cultura Dulbecco (DMEM) na proporção de 1:3 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Para a separação da fração mononuclear da MO, foi utilizada a técnica modificada de Böyum (1968), a qual

utiliza um gradiente de densidade o Ficoll-Hypaque ($d=1.077 \text{ g/mL}$). Em um tubo contendo 10 mL de Histopaque (Sigma Chemical, MO, USA) foram adicionados, delicadamente, 25 mL da MO diluída em meio de cultura e centrifugado a 400 g por 30 minutos, com aceleração mínima, sem frenagem e à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formou-se uma interface, entre o Histopaque e o plasma com meio, que contém as células mononucleares. Estas células foram separadas da solução, adicionadas ao meio DMEM e centrifugadas 1 ou 2 vezes a 400 g por 10 minutos, com aceleração e frenagem máximas, à temperatura ambiente, para lavagem e isolamento das células mononucleares, formando no fundo do tubo um botão de células (Figura 3). O sobrenadante foi removido e o botão celular homogeneizado e resuspendido em meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal, penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) (Gibco^{TM} Invitrogen, NY, USA).

As células foram plaqueadas em uma densidade de $1-2 \times 10^5$ células/cm² em frascos de cultura T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland) e cultivadas em estufa com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana, retirando-se a cada troca, as células não aderentes (linhagem hematopoética) até que ocorresse uma confluência celular de aproximadamente 80%, quando as células foram dissociadas utilizando a enzima tripsina/EDTA 0,25% (Gibco^{TM} Invitrogen^{TM}, NY, USA) para a expansão celular (passagem - P).

Figura 3 - A) Adição do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque ao aspirado de medula óssea e meio de cultivo; B) Anel de células mononucleares após primeira centrifugação; C) Botão de células mononucleares formado após segunda centrifugação

4.5 Viabilidade celular

Em cada passagem avaliou-se a viabilidade celular, a fim de se calcular a porcentagem de células viáveis. Para esta avaliação foi utilizado o corante azul de Tripan 0,4% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em solução salina. As células mortas apresentam alterações na permeabilidade da membrana permitindo a entrada do corante na célula. Assim, é possível distinguir as células viáveis e as células não viáveis (coradas) por microscopia de luz. Em 50 μ L de suspensão celular foram adicionados 10 μ L da solução do corante e aguardado cinco minutos antes da leitura. Em uma câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha), o número total de células e o número de células mortas (células azuis) foram contadas e a porcentagem de células viáveis calculada.

4.6 Análise e caracterização celular

Para caracterização do perfil de antígenos de superfície específicos de suínos, CTMs indiferenciadas entre a terceira e a quinta passagem ($P_3 - P_5$) foram marcadas com anticorpos anti-CD14, CD44, CD45, CD29 e MHC classe II suínos (VMRD,

Pullman, WA, EUA) e com os anticorpos anti-CD90 e CD34 humanos (BD Bioscience, CA, EUA).

Para a detecção dos antígenos específicos de suínos (não conjugados comercialmente à proteína fluorescente), 5×10^4 células distribuídas em 8 tubos foram lavadas com 500 μL de tampão salina fosfatada (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e centrifugadas a 400g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 15 μL (15 $\mu\text{g/mL}$) de cada um dos anticorpos primários, por 15 minutos em gelo, e novamente lavadas por três vezes. Posteriormente, 5 μL do anticorpo secundário (camundongo anti-porco) (BD Biosciences, WA, USA) conjugado à proteína fluorescente ficoeritrina foi adicionado a cada um dos tubos e incubado durante 15 minutos. As células foram lavadas com tampão salina fosfatada e resuspendidas em 500 μL da mesma solução com 1% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich Corp, MO, EUA). Anticorpos isotípicos IgG1 (BD PharMingen, CA, EUA) foram utilizados como controle. As células também foram marcadas com 5 μL (0,2 mg/mL) do anticorpo anti-CD90 humano e 10 μL (0,025 mg/mL) do anticorpo anti-CD34 humano, ambos conjugados com proteína fluorescente ficoeritrina. Cinco μL do corante vital 7AAD foram utilizados para avaliar a viabilidade celular. As células foram lavadas com soro bovino fetal, incubadas com os anticorpos por 30 minutos, lavadas novamente e resuspendidas em 500 μL de solução tampão salina fosfatada com 1% de paraformaldeído. Cerca de 100 mil células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, NJ, EUA) e analisados pelo programa FlowJo (FlowJo, OR, EUA).

4.7 Procedimentos de diferenciação celular

Foi analisado o potencial de diferenciação das CTMs-MO em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Foram utilizadas 20.000 a 30.000 células entre a terceira e a quinta passagem ($P_3 - P_5$) para cada experimento.

4.7.1 Diferenciação osteogênica

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) e induzidas à diferenciação osteogênica. Quando

houve cerca de 80% de confluência celular, adicionou-se o meio para a indução da diferenciação *Poietics™ Differentiation Basal Medium Osteogenic* (Cambrex Bio Science, MD, USA). As células foram cultivadas durante 21 dias, trocando-se o meio a cada três dias. A diferenciação osteogênica foi evidenciada utilizando o corante *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nos pH 7,0 e 4,2, o qual cora cristais de cálcio. As células controle foram mantidas em meio DMEM com 15% de soro bovino fetal durante 21 dias.

4.7.2 Diferenciação adipogênica

As células foram plaqueadas sobre lamínulas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) e induzidas à diferenciação adipogênica. Quando houve cerca de 80% de confluência celular adicionou-se o meio para a indução da diferenciação *Poietics™ Differentiation Basal Medium Adipogenic* (Cambrex Bio Science, MD, USA). As células foram cultivadas durante 21 dias, trocando-se o meio a cada três dias. A diferenciação adipogênica foi evidenciada por meio do corante *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), o qual permite a visualização de vacúolos lipídicos no interior das células. As células controle foram mantidas em meio DMEM com 15% de soro bovino fetal durante 21 dias.

4.7.3 Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica realizou-se a cultura em micromassa (crescimento celular em suspensão) utilizando o meio *Poietics™ Differentiation Basal Medium Chondrogenic* (Cambrex Bio Science, MD, USA), o qual foi trocado a cada três dias. No 21º dia, o agregado de células foi fixado em formalina a 10% por 1 hora à temperatura ambiente, desidratado com diluições seriadas de etanol e embebido em blocos de parafina. Foram feitos cortes com 4 μm e corados com *Alcian Blue* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A diferenciação condrogênica foi evidenciada pela coloração da matriz de mucopolissacarídeos, formada durante a diferenciação condrogênica. As células controle foram mantidas em meio DMEM com 15% de soro bovino fetal durante 21 dias.

4.8 Análise da diferenciação celular por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

As diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica também foram confirmadas por meio da técnica de RT-PCR, a qual avalia a expressão de genes específicos para cada linhagem das células cultivadas durante 21 dias em meio de indução e em meio DMEM com 15% de soro bovino fetal (controle). Os genes analisados foram AP2 (proteína ligante a ácido graxo), ALP (fosfatase alcalina óssea) e COL II (colágeno tipo II) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores e condições utilizadas para a técnica RT-PCR

Gene	Sequência do iniciador		Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
	Direto (5' - 3')	Reverso (3' - 5')		
GAPDH	GGCTACAGCAAC	GGGTCTGGGATGG	60	188
	AGGGTG	AAACT		
ALP	ATG AGC TCA	GTG CCC ATG GTC	56	131
	ACC GGA ACA A	AAT CCT		
AP2	GGC CAA ACC	GGG CGC CTC CAT	58	125
	CAA CCT GA	CTA AG		
Col2	CTG GAG CTC	CAG ATG CGC CTT	67.1	180
	CTG GCC TCG TG	TGG GAC CAT		

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ALP: fosfatase alcalina; AP2: proteína ligadora de ácido graxo, Col2: colágeno tipo 2.

4.8.1 Extração total de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos cultivos celulares controle ou induzido ou não à diferenciação foi extraído utilizando o kit *RNeasy* (Qiagen, Austin, TX), de acordo com as instruções dos fabricantes, e tratado na coluna com DNase I (Qiagen Inc, Austin, TX, EUA) O RNA foi dosado em espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (UNISCIENCE), em seguida as amostras foram utilizadas para a síntese de c-DNA.

Para a síntese de c-DNA, foi utilizado o kit de transcrição reversa IMPROM II (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante com 1 μ g de RNA total e 1 μ l de 10 μ M de iniciadores de oligo Dt (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA).

Em resumo, procedeu-se a concentração das amostras de RNA em membrana de microcon YM-30 (Millipore) para obter 1 μ g de RNA em 8,6 μ L. Ao RNA adicionou-se 1 μ L de Oligo dT 10 μ M e água ultra pura RNase *free* em quantidade suficiente para 9,6 μ l. O material foi incubado por 10 minutos a 70°C em equipamento termomixer modelo Confort (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Em seguida, adicionaram-se outros componentes do kit de transcrição reversa: 4 μ L do tampão de reação ImProm II, 2,4 μ L de MgCl₂ (25 Mm), 1 μ L de dNTPs (10 Mm), 2 μ L de Transcriptase Reversa (Promega, Madison, WI, EUA) além de 1 μ L RNase out (Promega, Madison, WI, EUA). Seguiu-se incubação por 2 horas a 42°C em equipamento *thermomixer*. Procedeu-se a digestão do RNA com a adição de 0,5 μ L de RNase H 2 U/ μ L (Promega, WI, EUA) e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Para purificação do c-DNA adicionou-se 400 μ L de água ultra pura e transferiu-se a solução para a membrana de microcon YM-30 (Millipore) e centrifugou-se a 14.500 rpm por 9 minutos. Reconstituiu-se o volume para 500 μ L com água ultra pura, foram feitas alíquotas de 20 μ L e o c-DNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

4.8.2 Reações de RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com 40 ng de c-DNA como molde, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 5 a 10 pmol de iniciadores (10 pmol de cada gene, Tabela 1), 2,5 mM de MgCl₂, 0,0625 mM dNTPs, 1 U de Taq polimerase d (Invitrogen, NY, EUA) e água ultra pura em volume adequado para completar 20 μ L de volume total da reação. O iniciador oligonucleotídico para a PCR utilizado define o tamanho do produto de amplificação e estão representados na Tabela 1.

Os parâmetros da reação de amplificação foram 94°C por 15 segundos, 50-62°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, e incubação final de 72°C por 3 minutos realizado em equipamento Termociclador Bio-Cycler II (Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad, CA, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados de ácidos nucleicos foi

verificado por eletroforese horizontal. Em resumo, os produtos da reação de PCR foram diluídos em tampão de amostra (Glicerol 10x, bromofenol blue 25% e xileno cianol FF 25% na proporção de 4:1 e aplicados 20 μ L por poço em gel de 2 % de agarose (Invitrogen, CA, EUA), foram utilizados 2,5 μ L de padrão de tamanho de pares de base 1 kb plus (Invitrogen, CA, EUA) previamente diluído em tampão de amostra, seguiu-se eletroforese horizontal em tampão TBE em voltagem de 50 a 80 mA por cerca de 45 minutos a 1 hora e 30 minutos. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução contendo 0,2 mg/mL de brometo de etídeo em água por 20 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em água destilada por 5 a 10 minutos. Para visualização dos ácidos nucléicos corados com brometo de etídeo, foi utilizado um UV Transiluminator Model M-26 (Ultra-Violet Products Ltda) e as imagens digitalizadas utilizando um *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* e o *software* Kodak 1D v.2.0.3 (Eastman Kodak Company, NY, EUA).

As amostras foram normalizadas pela expressão de um gene constitutivo, no caso GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

4.9 Preparo da associação de CTMs-MO+PRP para transplante

O gel de PRP foi utilizado juntamente com as CTMs-MO (CTMs-MO+PRP) para preenchimento dos alvéolos previamente à instalação dos implantes. Para preparo do PRP foi utilizado o protocolo descrito por Rossi Júnior e Souza Filho (2004) e Vendramin et al. (2006). Um volume de 30 mL de sangue venoso foi coletado de cada animal, por meio de punção periférica. O sangue foi coletado da veia auricular pela facilidade de acesso, e com auxílio de uma cânula luer, o sangue foi gotejado para dentro do microtubo estéril contendo anticoagulante citrato de sódio 3,2% (Becton Dickinson, NJ, USA) até o volume desejado. O volume de sangue foi transferido para um tubo cônico estéril, em fluxo laminar, e centrifugado a 130 g por 10 minutos a 22°C. As hemácias precipitam no fundo do tubo e na parte superior forma-se uma “zona névoa”, composta por algumas hemácias, os monócitos e plaquetas maiores. A parte superior contendo o plasma pobre e o plasma rico em plaquetas foi pipetado juntamente com 1 mL da zona névoa, e recolocado em outro tubo cônico, e centrifugado a 400 g por 10 minutos, a 22°C. Após finalizada a segunda centrifugação, o botão plaquetário ficou ao fundo do tubo e o plasma no sobrenadante. Parte dessa porção plasmática

(50%) foi retirada por pipetagem e acondicionada em outro tubo, constituindo o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP), utilizado para formação da trombina autógena, enquanto o restante do material foi resuspenso, constituindo o PRP. Para preparo da trombina autógena, foi adicionado ao PPP, 10% do seu volume de solução de gluconato de cálcio 10%, e esta mistura foi incubada em banho maria por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foi retirado o coágulo formado com uma pipeta Pasteur. O líquido restante é uma solução rica em trombina. Para formação do gel de PRP, foi misturado uma quantidade de PRP com a metade deste volume da solução rica em trombina.

No momento do transplante ($P_4 - P_5$), as células em cultura foram tripsinizadas, lavadas com soro bovino fetal e centrifugadas a 400 g por 10 minutos, com frenagem e aceleração máximas, à temperatura ambiente, para formação do botão de CTMs. Foi feita a contagem do número de células mesenquimais e a viabilidade celular. Para cada animal, 40×10^6 células foram adicionadas ao gel de PRP para preenchimento dos alvéolos (10×10^6 células por alvéolo) previamente à instalação dos implantes (Figura 4).

Figura 4 - A) Botão de CTMs-MO; B) PRP; C) Associação de CTMs-MO+PRP; D) Porções do gel de CTMs-MO+PRP para preenchimento de cada alvéolo previamente à instalação dos implantes

4.10 Grupos experimentais

Grupo A (Controle/ sem RT): O grupo controle foi composto por quatro *Minipigs BR1* que não foram submetidos à RT em nenhum momento da pesquisa. Os animais foram submetidos à exodontia dos terceiros e quartos pré-molares inferiores bilaterais. Imediatamente após as extrações, os quatro alvéolos da hemimandíbula direita (lado experimental) foram preenchidos com a associação de CTMs-MO+PRP e quatro implantes de titânio foram instalados. Na hemimandíbula esquerda (lado controle) os alvéolos foram preenchidos somente com sangue e os implantes foram instalados sem o uso da associação. Para recobrimento dos implantes, previamente à sutura, foi colocada uma barreira biológica osteoprotetora reabsorvível. Após 90 dias os animais foram eutanasiados e as interfaces osso/implante analisadas histologicamente.

Grupo B (implantes pré-RT): Quatro *Minipigs BR-1* foram submetidos ao mesmo protocolo cirúrgico do Grupo A, e após 15 dias, os animais foram submetidos à RT na região bilateral de mandíbula. Após 90 dias os animais foram eutanasiados e as interfaces osso/implante foram analisadas histologicamente.

Grupo C (implantes pós-RT): Quatro *Minipigs BRI* foram submetidos à RT na região bilateral de mandíbula, sob mesmo protocolo do Grupo B. Após 90 dias do término da radioterapia, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo cirúrgico do Grupo A.

4.11 Extrações dentárias, preparo dos alvéolos e instalação dos implantes

Para realização das exodontias e instalação dos implantes, os animais foram submetidos à anestesia geral com intubação oro-traqueal (Figura 5A). A antisepsia extraoral foi realizada com solução de iodo degermante e intra oral com solução de iodo tópico. Para visualização da parte radicular dos dentes pré-molares a serem extraídos, foram realizadas radiografias periapicais com auxílio de posicionadores radiográficos (Figuras 5B e 5C) e filme radiográfico intra-oral AGFA Dentus M2 Comfort (Heraeus Kulzer).

No local das extrações foi infiltrada lidocaína 2% para hemostasia local durante procedimento cirúrgico. Foi realizada uma incisão intrasulcular com lâmina de bisturi 15c, se estendendo do segundo pré-molar ao primeiro molar inferior de cada lado, com descolamento total do retalho. Foram extraídos os dentes terceiros e quartos pré-molares inferiores do lado direito e esquerdo de cada animal dos grupos A, B e C. Para facilitar a exodontia sem provocar fratura radicular e sem danificar as paredes ósseas, primeiramente foi realizada odontosseção vertical como uso de broca Carbide de tungstênio 701L (Komet Brazil, Santo André, Brasil) em peça de mão e irrigação abundante com soro fisiológico (Figura 5D). Após odontosseção, com auxílio de distratores, as raízes foram extraídas individualmente (Figura 5E). Radiografias periapicais foram realizadas imediatamente após as exodontias (Figura 5F). Na região

de cada alvéolo foram realizadas perfurações, as quais seguiram a seguinte sequência: broca lança, brocas helicoidal 2.0 e 2.8 e broca *Countersink* 3.3 (NEODENT, Curitiba, Brasil) em alta velocidade (2000rpm), com irrigação abundante com soro fisiológico, como preconiza a técnica cirúrgica para inserção de implantes segundo Brånemark (1998).

No lado controle, os alvéolos foram preenchidos somente com sangue e os implantes foram instalados (Figura 5G). No lado experimental, após as perfurações dos alvéolos, os mesmos foram preenchidos com a associação de CTMs-MO+PRP, seguindo-se da instalação dos implantes (Figuras 5G1-G3). Foram utilizados implantes auto-rosqueáveis de titânio do tipo Cone Morse de 3,5 mm de diâmetro por 9,0 mm de comprimento (NEODENT, Curitiba, Brasil). Os implantes foram instalados em baixa velocidade (20rpm) e tapados com parafuso de cobertura. O torque de travamento apical mínimo requerido foi de 35N, conferido por meio de um torquímetro cirúrgico manual (NEODENT, Curitiba, Brasil). Todos os implantes foram instalados a nível ósseo ou infra-ósseo. Previamente à sutura, uma barreira biológica osteoprotetora reabsorvível de origem bovina (GenDerm, Genius SA Baummer, Brasil) foi posicionada sobre o rebordo alveolar e implantes (Figura 5H). A sutura foi realizada com fio reabsorvível de poligalactina 910 4-0 (Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, USA) (Figura 5I). Foram realizadas radiografias periapicais de cada lado da mandíbula imediatamente após o término da cirurgia (Figura 5J).

Figura 5 - Sequência de procedimentos cirúrgicos. A) Animal sob anestesia geral; B) Aspecto clínico inicial dos dentes pré-molares; C) Aspecto radiográfico inicial; D) Odontosseção sagital; E) Alvéolos frescos; F) Aspecto radiográfico pós-exodontia; G) Implantes recém instalados no lado controle; G1) Transplante do gel de CTMs-MO+PRP; G2) instalação do implante no alvéolo contendo CTMs-MO+PRP; G3) Implantes recém instalados no lado experimental; H) Colocação da membrana osteoprotetora; I) Sutura e J) Aspecto radiográfico final

4.12 Radioterapia

A RT foi realizada no Serviço de Radioterapia do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba/PR, após autorização do Dr. Sérgio Araquém Mattos Ferreira, chefe médico do Serviço de Radioterapia do HEG, da Dra. Tatiane Cristina de Oliveira Fernandes, chefe do Serviço de Física Médica, sob orientação do Dr. Gustavo Henrique Smaniotto, médico radioterapeuta do serviço, os quais participaram do projeto como colaboradores.

A radiação ionizante utilizada para a RT foi o cobalto (Cobalt 60, Theratron 780C - MDS Nordion, Ontário, Canadá). Para garantir o campo de radiação na região de mandíbula bilateral, utilizou-se uma máscara facial durante as sessões, confeccionada com material termoplástico (Rolyan Aquaplast Splinting Materials, Sammons Preston, Illinois, USA) (Figura 6).

A dose total de irradiação para cada lado da mandíbula foi de 24 Gy, fracionada em três doses de 8 Gy, com intervalo de 7 dias para cada dose (Verdonck et al., 2008). Utilizando-se o índice α/β de 2,5 de equivalência, esta dose apresenta-se biologicamente equivalente a aproximadamente 56 Gy, com 28 exposições de 2 Gy cada. Após as sessões de radioterapia, os animais foram levados novamente ao biotério da Universidade Positivo, onde permaneceram até o momento da eutanásia.

Figura 6 - Animal durante sessão de radioterapia com uso de máscara facial termoplástica

4.13 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados 90 dias após a instalação dos implantes. Primeiramente foram sedados pela administração intramuscular da associação de 10 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Syntec, Brasil) e 3 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (Vetbrans, Brasil). Em seguida, os animais foram mortos com a administração endovenosa de dose letal (maior que 100mg/kg de peso) de pentobarbital sódico (Cristália, Brasil).

4.14 Avaliação macroscópica dos espécimes

Após a eutanásia, a mandíbula de cada animal foi dissecada, descolando-se todo o tecido muscular e mucoperiósteo. As peças foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de implantes expostos ao meio bucal, presença de mobilidade e sinais de infecção. A região óssea contendo os implantes foi removida com auxílio de uma

serra tipo fita com margem de segurança de 1 cm de cada lado do primeiro e do último implante (Vetec Química Fina, Brasil), devidamente numerados e identificados por grupo.

Os blocos ósseos foram então radiografados para confirmar a presença dos implantes e o posicionamento dos mesmos. O número de implantes perdidos em cada grupo foi então determinado, obtendo-se o percentual de implantes perdidos (PIP). As amostras que continham os implantes foram encaminhados para processamento laboratorial no Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, sob orientação do Dr. Renato Paulo Chopard.

Os blocos ósseos contendo os implantes foram fixados em solução de formol a 10% tamponado durante 10 dias. Foram lavados em água corrente por duas horas para eliminação do fixador. Posteriormente, foram desidratados em concentrações ascendentes de álcool de 70% até 100%, permanecendo uma hora em cada concentração. Para a diafanização, a peça foi mergulhada em xilol por 24 horas e por mais 48 horas em novo frasco contendo xilol.

Para inclusão da peça em resina, a mesma foi mergulhada em frasco de vidro com tampa, o qual serviu de molde para o bloco. Para a penetração da resina na peça, as mesmas permaneceram imersas em solução contendo 15% de dibutilftalato e 85% de metilmetacrilato (Solução A) (ALDRICH, Rio de Janeiro, Brasil), por 3 a 5 dias. Após este período, as peças permaneceram de 3 a 5 dias na Solução A acrescida de 1% de peróxido de benzoíla (MERCK S.A. Indústrias Químicas, Brasil), e mais 3 a 5 dias na Solução A acrescida de 2,5% de peróxido de benzoíla. Os frascos foram mantidos em geladeira durante todo este período, permitindo que o material resinoso pudesse penetrar no bloco ósseo de maneira homogênea. A polimerização final da resina foi realizada mantendo-se os frascos em estufa a 32°C por 20 dias. Após a polimerização total da resina, os frascos de vidro foram quebrados, e os blocos de resina foram cortados com o auxílio de uma serra formando um bloco retangular (Figura 7A).

Para a microtomia das peças, foi utilizado o micrótomo de impacto EXAKT-Cutting Griding System 400CP (Kulzer, Norderstedt, Alemanha), do Laboratório de Tecidos Mineralizados do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, o qual foi ajustado para cortes de 20 µm de

espessura, axialmente em relação ao longo eixo dos implantes (Figura 7B-C), utilizando a técnica descrita por Donath e Breuner (1982) para tecidos duros.

Um dos lados do corte era então polido com lixas abrasivas de carbetto de silício não ferroso, na sequência das seguintes granulações: 800, 1000, 1500, 2000, 2500 e 4000, utilizadas em uma politriz (Politriz Petalográfica DP-10, Panambra/ Struers, Cambuci, SP, Brasil), sob irrigação constante de água. Após polimento, a peça era seca com papel absorvente e o lado polido colado com éster de cianoacrilato (Super Bonder, 3M) em uma lâmina de acrílico incolor e transparente de 2 mm de espessura para manipulação e acabamento final. O outro lado do corte era então polido na mesma sequência de lixas, até uma espessura final média de 10 μm , aferida por meio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil). Foram confeccionadas 2 lâminas para cada implante.

Figura 7 - A) Inclusão do bloco ósseo em resina metilmetracrilato; B) micrótomo de impacto; C) Vista do bloco após microtomia

4.15 Coloração das lâminas

As amostras foram preparadas para análise em microscópio de luz convencional, por meio das colorações Azul de Toluidina e Azul de *Stevenel* com Alizarina Vermelha.

Para a coloração com Azul de Toluidina, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (QEEL, Brasil) por 5 minutos, posteriormente lavadas com água corrente e secas com papel toalha. Em seguida as mesmas foram imersas em solução aquosa de Azul de Toluidina (QEEL, Brasil), permanecendo por 40 minutos.

Na sequência as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e seca com papel toalha. Foi aguardado um período de 24 horas para a completa secagem do corante.

Para a segunda coloração, utilizou-se a combinação da coloração azul de *Stevenel* contra-corada com vermelho de Alizarina conforme descrito por Maniatopoulos et al. (1986). Primeiramente as lâminas foram coradas com azul de Stevenel (em estufa a 60°C, por 15 minutos, lavadas com água destilada também à 60°C e secas com papel absorvente. Em seguida, algumas gotas de vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram colocadas sobre as lâminas à temperatura ambiente por 5 minutos, e lavadas com água destilada até a retirada do excesso de corante.

4.16 Obtenção das imagens fotomicrográficas

As imagens fotomicrográficas foram captadas no Departamento de Patologia Bucal da FOUSP, sob supervisão do Professor Dr. Décio dos Santos Pinto Junior. O equipamento é composto por um microscópio de luz óptica (AxioScope, ZEISS, Jena, Alemanha), acoplado a uma câmera digital especial para microfotografia e a um computador (AxioVision Rel. 4.8 / AxioCam HRc, Jena, Alemanha).

Cada imagem foi composta por 2 a 3 roscas de um dos lados do implante em um aumento de 100 vezes. As imagens foram unidas formando toda a extensão de cada lado do implante, e então salvas como uma nova imagem em formato TIFF. Para cada implante foram geradas 2 imagens (lado 1 e lado 2), as quais foram analisadas separadamente, utilizando o programa IMAGE ProPlus 5.1.2.59. Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. As amostras foram submetidas à análise histológica (qualitativa) e histomorfométrica (quantitativa).

4.17 Análise histológica e histomorfométricas das amostras

Todos os implantes que permaneceram após 90 dias da instalação foram analisados ao longo eixo do implante, por meio de microscopia de luz. A observação histológica da interface osso-implante de ambos os lados do implante foi realizada sob

microscopia de campo claro em todas as amostras, nos três grupos, lados experimental e controle. Procurou-se avaliar as características teciduais gerais do processo de osseointegração em cada grupo, por meio da observação do tecido ósseo neoformado e seus elementos celulares típicos, como a presença de osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e matriz osteóide.

Os implantes de um mesmo porco foram considerados como unidades de observação independentes. As amostras que apresentaram qualquer quantidade de tecido ósseo mineralizado em contato com a superfície do implante foram submetidas à análise histomorfométrica referente ao percentual de contato-osso-implante (COI). As amostras que apresentaram qualquer quantidade de tecido ósseo dentro das áreas delimitadas pelas roscas do implante foram submetidas à análise referente à densidade óssea no interior das roscas (DOIR). Os dois lados de cada implante foram analisados separadamente (L1 + L2) e então a média das medidas foi calculada.

As amostras que não apresentaram nenhuma quantidade de matriz óssea mineralizada em contato com a superfície do implante e nem ao redor das roscas do implante, de ambos os lados, foram consideradas como fibrointegração. Embora estes casos tenham apresentado valores de COI e DOIR iguais a zero em ambos os lados avaliados, eles não foram excluídos da análise estatística.

Para a análise do percentual de COI foi realizada a medição linear longitudinal da superfície total de um lado do implante, desde o início da primeira rosca até o final da última rosca visível no corte. Em seguida foi mensurada a superfície total do COI em toda a extensão do implante, multiplicada por 100 e dividida pela superfície total do implante. A mesma mensuração foi realizada no outro lado do implante e a média dos dois lados foi obtida.

Para a análise da DOIR primeiramente foi calculada a área total no interior de todas as roscas de um dos lados do implante. Posteriormente foi determinada a área preenchida por matriz óssea mineralizada dentro das roscas do mesmo lado. A soma total da área de matriz óssea mineralizada foi multiplicada por 100 e dividida pela soma total da área no interior das roscas. A mesma mensuração foi realizada no outro lado do implante e a média dos dois lados foi obtida.

As figuras 8 e 9 ilustram as marcações delimitadas nos cortes para análise histológica do percentual de COI e da DOIR, respectivamente.

Figura 8 - Imagem digitalizada demonstrando as marcações nos cortes para análise do percentual de contato osso-implante, onde a linha vermelha corresponde à superfície total do implante e a linha verde ao contato osso-implante

Figura 9 - Imagem digitalizada demonstrando as marcações nos cortes para análise da densidade óssea no interior das roscas, onde a marcação vermelha representa a área total no interior da rosca e verde, a área de matriz óssea mineralizada no interior da rosca.

4.18 Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos foram editados e tabelados no programa Excel. Os resultados do RT-PCR para cada gene de estudado e os valores da densidade óptica relativa das bandas imunorreativas foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste t de *Student*. Os dados foram analisados com o programa computacional GraphPad Prism 5.

Os resultados dos parâmetros PIP, COI e DOIR foram descritos por médias, medianas (Min-Máx) e desvio-padrão. Para a comparação dos grupos A, B e C, considerando-se os lados controle e experimental, utilizou-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para a comparação dos lados controle e experimental dentro de cada grupo, considerou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

Para todos os testes realizados foram considerados estatisticamente significante os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das CTMs-MO de *Minipigs BR-1*

As primeiras colônias de CTMs-MO de *Minipigs BR-1* foram observadas após quatro a cinco dias de cultura e cerca de 80 – 90% de confluência celular foi obtida em torno do 10º dia. A eficiência de isolamento das CTMs-MO foi de 100% (12/12) e em cultura, estas células apresentaram morfologia fibroblastóide (Figura 10).

Figura 10 - Morfologia das CTMs-MO de *Minipigs BR-1* nos aumentos de 40X (A) e 100X (B)

O número total de células mononucleares isoladas em cada amostra variou de $122,5 \times 10^6$ a $244,0 \times 10^6$ células. A média de células mononucleares por mL de MO foi de $5,1 \times 10^6$ e a viabilidade celular média foi de 90,8%. (Tabela 2). No momento do transplante ($P_4 - P_5$), a média do número de CTMs obtidas foi de $84,3 \times 10^6$, com viabilidade celular média de 95,5% (Tabela 3).

Tabela 2 - Volume em mL de medula óssea (MO) coletado da crista ilíaca de *Minipigs BR-1*; número total de células mononucleares obtidas; número de células por mL e viabilidade celular após o isolamento celular.

Amostra	Vol. de MO (mL)	Nº de células	Células/ mL	Viabilidade (%)
1	30	183,5 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁶	87,0
2	30	122,5 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	95,2
3	30	181,7 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁶	94,0
4	30	176,2 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁶	83,0
5	35	222,5 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁶	93,5
6	35	211,5 x 10 ⁶	6,0 x 10 ⁶	93,6
7	40	127,5 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	94,7
8	40	218,2 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁶	94,0
9	30	126,3 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	93,0
10	30	197,7 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶	91,0
11	35	122,8 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	87,8
12	30	100,0 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	83,0
Média	34,7	171,8 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁶	90,8
DP	(4,6)	(44,8 x 10 ⁶)	(3,9 x 10 ⁶)	(1,3)

FONTE: dados da pesquisa

DP = desvio-padrão; mL = microlitros

Tabela 3 - Número de células mononucleares e viabilidade celular no dia do transplante (P₄–P₅).

Amostra	N ^o células	Viabilidade (%)
1	50,0 x 10 ⁶	87,5
2	70,0 x 10 ⁶	93,0
3	154,0 x 10 ⁶	98,0
4	120,0 x 10 ⁶	96,3
5	72,5 x 10 ⁶	97,0
6	45,5 x 10 ⁶	96,2
7	50,0 x 10 ⁶	99,0
8	64,0 x 10 ⁶	96,4
9	93,0 x 10 ⁶	95,2
10	46,2 x 10 ⁶	95,5
11	41,5 x 10 ⁶	97,6
12	40,5 x 10 ⁶	97,8
Média	77,0 x 10 ⁶	95,9
DP	(33,0 x 10 ⁶)	(2,9)

FONTE: dados da pesquisa

DP = desvio-padrão

Em relação à expressão dos antígenos de superfície celular avaliados por citometria de fluxo, as CTMs-MO foram positivas para os marcadores CD90 (porcentagem média de 88,6%), CD29 (89,8%), CD44 (86,9%) e negativas para CD34 (1,6%), CD45 (1,8%), CD14 (1,8%) e MHC-II (2,7%) (Tabela 4 e Figura 11).

Tabela 4 - Expressão dos antígenos de superfície celular avaliados por citometria de fluxo.

Amostra	Antígenos de superfície (%)						
	CD90	CD29	CD44	CD34	CD45	CD14	MHC-II
1	86,6	89,8	90,5	0,2	0,1	0,1	0,2
2	81,1	81,5	87,8	0,2	1,4	1,2	2,5
3	87,3	87,6	76,7	0,1	0,1	0,1	0,1
4	89,4	69,4	72,2	0,1	1,9	2,1	2,0
5	96,8	97,3	93,8	1,6	1,0	2,5	1,6
6	74,4	75,9	77,0	0,2	0,2	0,4	0,2
7	94,2	95,3	94,3	3,9	1,9	2,5	4,4
8	88,4	87,3	93,5	3,0	3,1	3,2	6,0
9	88,4	90,5	93,1	0,5	2,4	0,8	1,9
10	93,0	83,9	93,7	1,0	1,7	1,8	1,9
11	95,2	82,9	85,5	5,0	4,7	3,8	8,6
12	88,6	87,2	85,1	3,5	3,5	2,7	2,9
Média	88,6	89,8	86,9	1,6	1,8	1,8	2,7
DP	(6,2)	(7,8)	(7,8)	(1,8)	(1,4)	(1,2)	(2,5)

FONTE: dados da pesquisa

DP = desvio-padrão

Figura 11 - Imunofenotipagem das CTMs-MO de *Minipigs BR-1*. Os histogramas são representativos de um experimento e os valores equivalem à média da porcentagem das células positivas. O controle isotípico está representado em vermelho e o histograma azul indica reatividade com o anticorpo indicado

As CTMs-MO, quando cultivadas durante 14-21 dias em meios suplementados com os fatores de indução a diferenciação para as linhagens osteoblástica, adipocítica e condrocítica, demonstraram a presença de matriz mineralizada, de vacúolos lipídicos no interior das células e a presença de células cuboidais e lacunas ao redor dos condrócitos jovens, respectivamente. As células cultivadas durante o mesmo período em meio de cultura sem os fatores de indução a diferenciação, não exibiram diferenciação espontânea (controle) (Figura 12).

Figura 12 - Diferenciação das CTMs-MO em osteoblastos (B), adipócitos (D) e condrócitos (F) após 14-21 dias de cultura na presença de fatores de indução, evidenciada respectivamente pelas colorações *Alizarin Red S*, *Oil Red O* e *Alcian Blue*. As setas indicam a matriz mineralizada (B), a presença de vacúolos lipídicos no interior das células (D) e a presença de células cuboidais e lacunas ao redor dos condrócitos jovens (F). As células cultivadas durante o mesmo período em meio sem os fatores de indução a diferenciação, não demonstraram diferenciação espontânea (A, C, E). Aumentos de 100X (A, B) e 400X (C, D, E, F).

A maior expressão gênica de AP2, ALP e COL II em células induzidas também confirmou o potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos, com significância estatística ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,031$ respectivamente). As quantificações relativas dos níveis de mRNAs normalizadas com o gene GAPDH foram, respectivamente para as células controle e induzidas: 0,1 e 1,2 (AP2), 1,0 e 13,7 (ALP), 1,0 e 1,7 (Col II) (Figura 13).

Figura 13 - Análise da expressão gênica de marcadores da diferenciação das CTMs de Minipig BR-1 em adipócitos (AP2), osteoblastos (ALP) e condroblastos (COL II). As células foram cultivadas durante 21 dias com meio de indução. Foram avaliados os níveis de mRNAs por RT-PCR. GAPDH foi usado como controle. As análises foram feitas com os resultados obtidos de três culturas de células independentes e as reações de RT-PCR foram realizadas em triplicata. As bandas foram quantificadas por densitometria e normalizadas por GAPDH. Nos gráficos estão representadas as razões dos valores das células controle pelas células induzidas. Teste t de *Student*; * $p < 0,05$

5.2 Avaliação clínica dos espécimes ósseos

Todos os animais apresentaram mucosa bucal íntegra na região operada durante a eutanásia, 90 dias após a instalação dos implantes. Nenhum sinal de infecção ativa foi evidenciado. Nos animais do grupo A, os implantes apresentavam-se recobertos por gengiva e tecido ósseo em todos os casos. Já nos animais do grupo B, seis implantes apresentaram-se com exposição do parafuso de cobertura e em relação aos animais do grupo C, 4 implantes apresentaram mais da metade de seu comprimento exposto ao meio bucal, dos quais 2 apresentavam mobilidade (Figura 14).

Figura 14 - Exemplos das mandíbulas dissecadas logo após eutanásia dos animais. A) Grupo A (controle/ não irradiado); B) Grupo B (implantes pré-radioterapia); C) Grupo C (implantes pós-radioterapia)

5.3 Avaliação do percentual de implantes perdidos (PIP)

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao PIP na comparação dos três grupos, tanto no lado controle ($p=0,041$) como no experimental ($p=0,047$), sendo que em ambos os lados o número de implantes perdidos foi maior nos grupos irradiados (B e C) que no grupo controle (A). O PIP foi aproximadamente três vezes maior quando o implante foi instalado pós-RT, em comparação ao osso não irradiado. Estes dados indicam um efeito negativo da radiação ionizante na estabilidade e consequente perda do implante, sendo que o efeito é pior quando o implante é instalado pós-RT (grupo C) comparado ao pré-RT (grupo B).

Tabela 5 - Percentual de implantes perdidos instalados (PIP) em alvéolos frescos em mandíbula de *Minipigs BR-1*, avaliados após 90 dias.

Lado	Grupo	PIP(%)	Mediana (Min-Máx)	Valor de p^*
Controle	A	25,0	1,0 (0,0-2,0)	0,041
	B	31,2	1,0 (1,0-2,0)	
	C	68,7	2,5 (2,0-4,0)	
Experimental	A	18,7	0,5 (0,0-2,0)	0,047
	B	25,0	1,0 (0,0-2,0)	
	C	68,7	2,5 (2,0-4,0)	

Legenda: Grupo A (controle/ não irradiado); Grupo B (implantes pré-radioterapia); Grupo C (implantes pós-radioterapia); Experimental: uso de CTMs-MO+PRP

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Uma vez que houve diferença na comparação dos três grupos, os mesmos foram então comparados em pares. Tanto no lado controle como no experimental, a perda de implantes foi igual nos grupos A e B ($p>0,05$) e diferente na comparação destes grupos com o grupo C ($p<0,05$), com resultados piores na comparação dos grupos A e C (Tabela 6). Estes resultados demonstram que a colocação dos implantes pós-RT afetou o PIP (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de p na comparação dos grupos em pares, em relação ao percentual de implantes perdidos.

Grupos comparados	Valor de p^*	
	Lado	Lado
	controle	experimental
A x B	0,673	0,689
A x C	0,010	0,013
B x C	0,020	0,025

FONTE: dados da pesquisa

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Em seguida, foi realizada a comparação dos lados controle e experimental em cada grupo. Embora o número de implantes perdidos tenha sido maior no lado controle que no lado experimental nos grupos A e B, esta diferença não foi estatisticamente

significante em ambos os grupos ($p>0,05$). No grupo C, o PIP foi o mesmo para os dois lados testados (Tabela 7). Estes dados indicam que o uso da associação CTMs-MO+PRP não interferiu na perda dos implantes em nenhum dos grupos.

Tabela 7 - Comparação entre os lados controle e experimental em relação ao percentual de implantes perdidos.

Grupos	Valor de p^*
	(Controle x Experimental)
A	0,686
B	0,686
C	1,000

FONTE: dados da pesquisa

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

5.4 Análise histológica e histomorfométrica das amostras

A primeira análise histológica das amostras indicou os casos que apresentaram falha no processo de osseointegração, uma vez que não houve a formação de tecido ósseo mineralizado em contato ou no interior das roscas do implante (Figuras 15 e 16). Nestes casos, observou-se ao redor do implante a presença de uma matriz hialina, rica em fibroblastos e fibrócitos, sem presença de tecido ósseo, sendo estes casos considerados como fibrointegração. Em algumas regiões também foi evidenciada atividade osteoclástica, com reabsorções do tecido ósseo mineralizado adjacente ao implante (Figura 17). Não foi observado nenhum caso de fibrointegração no lado controle do grupo A; no lado controle dos grupos B e C, 18,2% e 20,0% dos casos apresentaram fibrointegração. Já no lado experimental, 7,7%, 25,0% e 40,0% dos implantes apresentaram fibrointegração nos grupos A, B e C respectivamente.

Figura 15 – Fotomicrografia com vista panorâmica de implante com fibrointegração. Observa-se tecido conjuntivo ao redor do implante, sem nenhuma evidência de neoformação óssea. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 12,5X

Figura 16 - Fotomicrografia de amostra do grupo C, lado experimental, mostrando ausência de tecido ósseo periimplantar (cor vermelha). Nota-se presença somente de tecido fibroso ao redor do implante (cor azul). Coloração: Azul de *Stevenel* com Alizarina Vermelha. Barra: 100µm

Figura 17 - Fotomicrografia mostrando falha no processo de osseointegração, com ausência de tecido ósseo junto ao implante. Observa-se uma matriz óssea não mineralizada (MONM), rica em fibrócitos e fibroblastos, e presença de células multinucleadas (osteoclastos) em atividade (seta) próximo ao osso neoformado. Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 100X

A análise histomorfométrica das amostras que apresentaram qualquer quantidade de tecido ósseo mineralizado em contato com o implante e no interior das roscas revelou processo de neoformação óssea dentro dos parâmetros normais de osseointegração de implantes instalados em alvéolos frescos, após 90 dias de cicatrização. Foi evidenciada a presença de tecido ósseo em diferentes fases de maturação, com trabéculas ósseas e presença de espaços medulares variados de acordo com a amostra. Observou-se também presença de osteócitos e osteoblastos, matriz osteóide e matriz óssea não mineralizada (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografia mostrando neoformação óssea junto ao implante, característica da osseointegração. Presença de tecido ósseo maduro (TOM), osteócitos (OC), matriz óssea não mineralizada (MONM), linha de osteoblastos (OB) depositando a matriz osteóide (asterisco vermelho) e tecido ósseo jovem recém mineralizado (asterisco preto). Coloração: Azul de Toluidina. Aumento: 100X

Alguns implantes (2 no lado experimental do grupo B; 2 no lado experimental do grupo A e 1 no lado controle do grupo C) apresentaram COI e DOIR iguais a zero em somente um dos lados do implante, não sendo incluídos nos casos de fibrointegração, já que a média dos dois lados analisados foi maior do que zero.

Um implante instalado no lado experimental do grupo A e um no lado controle do grupo B não apresentaram nenhuma quantidade de tecido ósseo mineralizado em contato com o implante, porém apresentaram algumas áreas com neoformação óssea no interior das roscas, em direção à superfície do implante, com valores de COI igual a zero e DOIR maior que zero. Nestes casos, pode-se observar a presença de osteoblastos formando uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada, indicando atividade de neoformação óssea ao redor do implante, em direção à superfície do implante (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia mostrando percentual de COI igual a zero e DOIM maior que zero. Observar presença de rima de osteoblastos (setas vermelhas) ao redor do osso recém mineralizado, indicando atividade de neoformação óssea no interior das roscas do implante, em direção à superfície do implante

5.4.1 Análise do percentual de contato-osso-implante (COI) e da densidade óssea no interior das roscas (DOIR)

Os percentuais de COI no grupo A foi maior que nos grupos B e C tanto no lado controle ($p=0,033$) como no experimental ($p=0,046$) (Tabela 8). Comparando os grupos em pares, houve diferença apenas entre os grupos A e B ($p=0,017$) e A e C ($p=0,033$), indicando que a RT afetou o percentual de COI tanto para os implantes instalados pós-RT quanto pré-RT. Já no lado experimental, ao comparar os grupos dois a dois houve diferença apenas entre os grupos A e C ($p=0,018$), indicando que a RT interferiu negativamente apenas nos implantes instalados pós-RT.

Tabela 8 - Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p , em relação ao percentual de contato-osso-implante (COI).

Lado	Grupo	n	Média	Mediana (Min-Máx)	DP	Valor de p^*
Controle	A	12	39,0	38,3 (20,1-61,9)	15,2	0,033
	B	11	20,9	25,5 (0-45,0)	15,5	
	C	5	16,0	23,3 (0-28,5)	14,2	
Experimental	A	13	27,7	25,4 (0-67,2)	19,2	0,046
	B	12	16,4	10,5 (0-69,4)	20,3	
	C	5	7,1	3,1(0-20,3)	8,9	

FONTE: Dados da pesquisa

DP=desvio-padrão

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

A DOIR também foi maior no grupo A em relação aos grupos B e C, em ambos os lados, porém com diferença estatística somente no lado controle ($p=0,025$) (Tabela 9). A comparação em pares dos grupos no lado controle mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e B ($p=0,022$) e A e C ($p=0,014$), indicando que a RT afetou a DOIR tanto quando os implantes foram instalados pós-RT quanto pré-RT. No lado experimental, como não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,080$) em relação à DOIR, os grupos não foram comparados em pares.

Tabela 9 - Estatísticas descritivas de acordo com os grupos e os valores de p , em relação à densidade óssea no interior das roscas (DOIR).

Lado	Grupo	n	Média	Mediana (Min-Máx)	DP	Valor de p^*
Controle	A	12	46,8	49,9 (23,6-68,6)	16,3	0,025
	B	11	29,3	37,4 (0-51,0)	19,0	
	C	5	21,0	20,6 (0-46,8)	20,5	
Experimental	A	13	36,5	41,4 (0-78,9)	24,9	0,080
	B	12	24,1	18,0 (0-75,5)	24,0	
	C	5	11,6	5,4 (0-35,5)	15,1	

FONTE: Dados da pesquisa

DP=desvio-padrão

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Os lados controle e experimental de cada grupo foram comparados a fim de saber se o uso da associação CTM-MO+PRP afetou na neoformação óssea periimplantar. Apesar dos percentuais de COI e DOIR terem sido piores no lado experimental em relação ao controle nos três grupos, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos, indicando que o uso da associação não interferiu em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de p das comparações entre os lados controle e experimental, dentro de cada grupo.

Grupos	Valor de p^* (controle x experimental)	
	COI	DOIR
A	0,110	0,247
B	0,347	0,379
C	0,310	0,421

FONTE: Dados da pesquisa

*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

As figuras 20 e 21 ilustram fotomicrografias de amostras representativas dos três grupos, lados controle e experimental respectivamente. Nota-se que a extensão do COI e a DOIR foram maiores no grupo A em relação aos grupos B e C, sendo que o grupo C os resultados foram ainda menores. Fica evidente também uma menor formação óssea periimplantar no lado experimental dos três grupos, comparado ao lado controle do mesmo grupo (Figura 22).

Figura 20 – Fotomicrografias de amostras representativas do lado controle dos três grupos estudados. A) Grupo A; B) Grupo B e C) Grupo C

Figura 21 – Fotomicrografias de amostras representativas do lado experimental dos três grupos estudados. A) Grupo A; B) Grupo B e C) Grupo C

Figura 22 – Fotomicrografias de amostras representativas dos lados controle e experimental dos grupos A (A e D respectivamente), B (B e E respectivamente) e C (C e F respectivamente). Coloração: Azul de Toluidina. Barra: 100 μ m

6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento, caracterização e diferenciação das CTMs-MO de *Minipigs BR-1*

Grandes avanços em pesquisas na área de engenharia tecidual têm sido obtidas em modelos animais. O uso de miniporcos em pesquisa experimental possui vantagens uma vez que o animal apresenta características e dimensões semelhantes ao organismo humano, aproximando as experiências de ensaios clínicos em medicina humana (Plánka et al., 2009). Além disso, miniporcos assemelham-se aos seres humanos em termos de contagem plaquetária, parâmetros de coagulação, taxa metabólica, estrutura óssea e características das CTMs (Aerssens et al., 1998, Thorwarth et al., 2005). Células-tronco isoladas de diferentes fontes e diferentes animais têm sido reconhecidas por expressarem marcador específicos da superfície celular, mas seus níveis de expressão têm variado de acordo com a espécie e local de origem (Vacanti et al., 2005, Nakamura et al., 2007, Plánka et al., 2009).

O isolamento, cultura e caracterização fenotípica de CTMs-MO de diferentes espécies de suínos já foram previamente descritas (Ringe et al., 2002; Chang et al., 2003; Guo et al., 2009). No entanto, as CTMs-MO da única espécie de miniporcos brasileiros (*Minipig BR1*) ainda não havia sido caracterizada. Na maior parte dos trabalhos, as CTMs não são completamente caracterizadas e não há informação disponível no que diz respeito à análise simultânea de uma ampla variedade de marcadores de superfície, moléculas de histocompatibilidade e de adesão celular (Casado et al, 2012).

Apesar da atratividade das CTMs-MO na engenharia tecidual, existem limitantes como dor durante procedimento de coleta, necessitando de anestesia local ou geral (Kwan et al., 2007), além da baixa frequência destas células no estroma da MO, embora apresentem rápida expansão em cultura (Banfi et al., 2000). A expansão de células estromais da MO promovem uma perda gradual do seu potencial de diferenciação, além de diminuir a capacidade proliferativa a cada passagem. Para os autores, fatores como tempo e condições de cultura podem ser cruciais para o uso clínico bem-sucedido dessas células.

No presente estudo, CTMs de origem suína foram obtidas por aspiração de MO proveniente da crista ilíaca, conforme descrito na literatura, com uma ligeira modificação (Boyum, 1968).). O protocolo de isolamento e cultivo das CTMs-MO de Minipigs BR-1, foi o mesmo utilizado para as células humanas, sendo observada uma taxa de sucesso de isolamento de 100% (12/12), assim como no estudo de Rebelatto et al. (2008) realizado com CTMs-MO humanas, mostrando que embora as espécies sejam diferentes, o protocolo pode ser utilizado com segurança (Plánka et al., 2009).

Em relação ao volume aspirado de MO, foi observado que não há necessidade de se coletar uma grande quantidade de MO para adquirir um número suficiente de células mesenquimais para cultivo e terapia celular. Um estudo semelhante em miniporcões descreveu que 5 mL de aspirado de MO é suficiente para obtenção de 2 milhões de células em 3 semanas de cultura, com viabilidade celular de 90% (Plánka et al., 2009). Com uma média de 35 mL de MO foi obtido o número suficiente de células para transplante em um prazo de 20 dias de cultura. A média de células mesenquimais isoladas foi de $5,1 \times 10^6$ /mL de aspirado de MO. A média de aspirado de MO no presente estudo foi maior que nos demais publicados, uma vez que foi utilizado 10×10^6 células por alvéolo testado, ou seja, 40 milhões de células por animal. A média do número de células mesenquimais em $P_4 - P_5$ foi de $84,3 \times 10^6$, com 90,8% de viabilidade celular. A rápida expansão e proliferação das CTMs durante o cultivo, com uma média de 18 dias até a terceira passagem, indica a facilidade de utilizar CTMs-MO de Minipigs BR-1 em ensaios pré-clínicos. Em um estudo semelhante realizado com *minipigs* japoneses, foram coletados 20 mL de MO e as CTMs foram isoladas e expandidas até uma concentração celular de cerca de 300×10^6 em um mês de cultura (Chang et al., 2003).

Os principais marcadores de superfície expressos em CTMs são as moléculas de adesão como as integrinas (CD29, CD49e) moléculas receptoras tais como hialuronato (CD44), caderina (CD144), proteínas de matriz extracelular (CD90, CD105), moléculas de adesão intracelular (CD54), moléculas de adesão vascular (CD106), proteínas reguladoras do complemento e antígenos de histocompatibilidade (MHC-II) (Gimble; Guialak, 2003). No entanto, a caracterização da expressão de marcadores de CTMs em animais é um desafio porque marcadores comerciais não estão disponíveis para as diferentes espécies e nem todos os anticorpos humanos e murinos reagem de forma cruzada com outras espécies (Tapp et al., 2009). Devido à dificuldade de obtenção de

anticorpos comerciais específicos para miniporcos, neste estudo foram utilizados os anticorpos CD90 e CD34 para as células humanas. A reatividade observada nas CTMs suínas utilizando anticorpos anti- CD90 e CD34 humano foi provavelmente devido à reação cruzada com CTMs humanas. Os outros anticorpos utilizados foram específicos para os antígenos suíno (CD14, CD45, CD44, CD29 e MHC-II). Nossos resultados concordam com um estudo anterior realizado com CTMs-MO de miniporcos, o qual relatou que mais de 95% das células foram positivas para CD29, CD44 e CD90 quando analisadas por citometria de fluxo, com viabilidade celular média de 90% (Plánka et al., 2009). Além de marcadores de CT, para determinar o potencial de imunogenicidade das CTM-MO de miniporcos, foi realizada a análise de moléculas de histocompatibilidade de classe II. Da mesma forma que os seres humanos, as CTMs de suínos mostrou uma expressão negativa de MHC-II (Casado et al., 2012).

Guo et al. (2009) isolaram e caracterizaram CTMs-MO de miniporcos chineses e determinaram, por citometria de fluxo, as porcentagens médias de 98,0% para CD29, 97,4% para CD44, 1,2% para CD34 e 3,5% para CD45, corroborando com os nossos resultados, onde as médias para os mesmos anticorpos foram 89,8%, 86,9%, 1,6% e 1,8%, respectivamente.

No presente trabalho, a diferenciação das CTMs-MO em adipócitos, osteoblastos e condrócitos foi obtida em cultura por 21 dias, utilizando-se os meios comerciais para diferenciação celular com fatores de crescimento específicos para cada linhagem, indicados para diferenciação de células mesenquimais humanas (*Poietics^{TM} Differentiation Basal Medium Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic*; Cambrex Bio Science, MD, USA). Os resultados indicam que os meios comerciais desenvolvidos para diferenciação das CT humanas podem ser utilizados para a espécie *Minipig BR-1*, sem diferença nos resultados. Não houve dificuldade nas etapas de diferenciação e visualização ao microscópio ópticos das células diferenciadas após colorações específicas.

Além da análise da diferenciação celular confirmada por coloração, o RT-PCR demonstra que as células isoladas a partir da MO de miniporcos brasileiros têm potencial de diferenciação em diferentes linhagens, não só morfologicamente, mas também a nível molecular (Rebelatto et al., 2008). A partir dos resultados encontrados, fica também indicado o uso destes marcadores para CTMs suínas. Em relação à expressão do marcador de diferenciação condrogênica (Col-II), embora tenha sido

também expresso nas células cultivadas em meio não induzido, o RT-PCR demonstrou que os níveis de RNAm foram maior em meio induzido, com diferença estatisticamente significativa.

A plasticidade das células progenitoras mesenquimais é essencial para futuras estratégias terapêuticas em terapia celular e engenharia de tecidos (Rebelatto et al., 2008). As CTMs-MO obtidas neste estudo demonstrou a capacidade de se diferenciar nas três linhagens, similares às células humanas (Vacanti et al., 2005, Rebelatto et al., 2008), mostrando que a espécie de miniporcospes brasileiros *Minipig BR1* pode ser utilizada em ensaios pré-clínicos de pesquisas relacionadas à medicina regenerativa.

6.2 Efeitos da RT e uso da associação CTM-MO+PRP na osseointegração de implantes dentários

Pacientes oncológicos submetidos à RT na região de cabeça e pescoço que necessitam de extrações dentárias ou qualquer tipo de procedimento cirúrgico na região de mandíbula apresentam risco para o desenvolvimento de osteorradioneecrose. Nestes pacientes, procedimentos cirúrgicos odontológicos como extrações dentárias devem ser evitados ou, quando necessários, devem ser realizados da maneira menos traumática possível, com cobertura antibiótica adequada e cuidados pós-operatórios, sendo contraindicada a instalação de implantes dentários. Por este motivo, o modelo cirúrgico escolhido para a realização deste trabalho foi o da instalação de implantes em alvéolos frescos, imediatamente após a exodontia, reduzindo o número de intervenções cirúrgicas. Todos os cuidados de assepsia foram respeitados e os animais receberam cobertura antibiótica pré e pós-operatória e analgesia adequada. Só não foi possível o controle adequado da ferida cirúrgica no pós-operatório, tanto em relação ao trauma e à higiene, como à restrição da mastigação sobre os implantes recém instalados, uma vez que o experimento foi realizado em suínos, embora qualquer outro modelo animal também fosse apresentar as mesmas limitações.

Branemark et al. (1969) relataram em pesquisa realizada em cães que os fatores que controlam a cicatrização e a estabilidade intra-óssea a longo prazo dos implantes de titânio requerem um preparo cirúrgico não traumático dos tecidos moles e duros, um implante química e mecanicamente asséptico, fechamento primário do retalho

mucoperiostal, isolando o implante dos micro-organismos da cavidade bucal e higiene oral para prevenir inflamação gengival. De acordo com Esposito et al. (1998) o trauma cirúrgico, juntamente com a carga prematura do implante, infecção e capacidade de cicatrização alterada parecem ser os motivos mais evidentes relacionados à perda precoce de implantes dentários. No presente estudo, o não cuidado da ferida cirúrgica associada à falta de higiene oral, aumentou o risco de deiscência do retalho, com consequente exposição e contaminação dos implantes, sendo os mesmo expulsos por um processo de inflamação aguda. Este fato pode explicar o número de implantes perdidos, observado inclusive no grupo não irradiado (grupo A). Já nos grupos B e C, o número de implantes perdidos foi ainda maior, já que a RT afeta a cicatrização dos tecidos. O PIP foi maior no grupo C em ambos os lados testados (68,7% cada), seguido do grupo B (31,2% no lado controle e 25% no experimental) e grupo A (25% no lado controle e 18,7% no experimental), com valores de $p=0,041$ no lado controle e $p=0,047$ no lado experimental. Observa-se que embora os valores do PIP tenham sido menores no lado experimental dos grupos A e B (18,7 e 25,0; 25,0 e 31,2 respectivamente), esta diferença não apresentou significância estatística ($p>0,05$).

Para evitar a perda precoce dos implantes instalados em mandíbulas ou maxilas em estudos experimentais com animais, diversos pesquisadores avaliam a osseointegração de implantes dentários em ossos como tíbia ou calota craniana. Apesar das limitações encontradas, a instalação dos implantes na mandíbula torna o modelo cirúrgico escolhido o mais próximo da realidade clínica. Quando um implante dentário é instalado em um osso recoberto por músculo e pele, o processo da neoformação óssea periimplantar é diferente do que se instalado na mandíbula ou maxila, uma vez que não recebe trauma mastigatório, e nem influencia das bactérias da boca. Nestes casos, os resultados dos experimentos pré-clínicos não são reproduzíveis na prática odontológica em humanos.

O sucesso dos implantes dentários depende de uma adequada osseointegração que se caracteriza por aposição íntima de osso neoformado na superfície do implante observada ao microscópio óptico e que é mantida quando esse implante é submetido a cargas funcionais (Albrektsson; Johansson, 2001). No presente estudo, a instalação de prótese sobre os implantes para finalizar o processo de osseointegração foi inviável, pelas dificuldades em realizar procedimentos como moldagem, confecção, instalação e manutenção da prótese em animais.

Apesar de existir certa variação quanto ao modelo animal em diferentes estudos publicados, há um consenso em relação ao efeito negativo da radiação ionizante na osseointegração de implantes dentários (Renau et al., 2001; Moy et al., 2005; Alsaadi et al., 2008; Ihde et al., 2009; Ocaña 2010). O efeito celular da RT é dose dependente, e estudos demonstram que complicações são raras em doses inferiores a 50 Gy, porém comuns entre 50 e 60 Gy, fracionadas em doses de 2 Gy cada (Murray et al., 1980). Entretanto, estudos realizados com dose única de radiação ionizante não são comparáveis clinicamente com os efeitos celulares provocados pela RT indicada para tratamento de neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço, uma vez que esta é realizada de maneira fracionada (Marx, 1994). Sendo assim, o protocolo radioterápico escolhido foi o mesmo utilizado por Verdonck et al. (2008), aproximando ao máximo o modelo da prática médica em humanos, uma vez que apresenta-se biologicamente equivalente a aproximadamente a 28 exposições de 2 Gy cada, totalizando 56 Gy. No estudo de Verdonck et al. (2008), os autores irradiaram cobaias e instalaram implantes em maxila. Após oito semanas, verificaram perda de 60% dos implantes instalados em osso irradiado e apenas 25% no osso não irradiado. Estes resultados assemelham-se aos do presente estudo, uma vez que se considerarmos somente o lado controle dos grupos A e C, a perda de implantes foi de 25% e 68,7% respectivamente. Assim como no presente estudo, os autores também não notaram diferença de estabilidade primária entre os grupos (irradiados ou não) no momento da instalação dos implantes.

Assim como nos estudos de Lukash e Sachs (1998), Asikainen et al. (1998) Brogniez et al. (2000), Renau et al. (2001), Verdonck et al. (2008), Ihde et al. (2009) e Ocaña (2010) o presente trabalho mostrou um efeito negativo da RT na osseointegração de implantes dentários. O índice de insucesso de implantes instalado em osso irradiado encontrado no estudo de Ihde et al. (2009) assemelha-se ao do presente estudo, uma vez que ambos foram de duas a três vezes maior quando comparado ao osso normal. Um estudo anterior realizado em *beagles* (Asikainen et al., 1998) corrobora os resultados aqui apresentados uma vez que os autores demonstraram que 100% dos implantes instalados no osso previamente irradiado (60 Gy) sofreram rápida reabsorção óssea, não ocorrendo a osseointegração em nenhum implante.

A instalação de implantes de titânio em alvéolos imediatamente após a extração dental, em leitos ósseos mais largos que o diâmetro dos implantes ou em áreas de quantidade e qualidade óssea deficientes, atualmente constituem a grande parcela das

situações clínicas encontradas no momento da avaliação e reabilitação oral do paciente, sendo um fator limitante para a osseointegração (Stentz et al., 1997; Buser et al., 1999). A indicação para estes casos seria utilizar terapias regenerativas na tentativa de acelerar o processo de regeneração óssea, favorecendo a neoformação óssea ao redor de implantes (Becker et al., 1997; Buser et al., 1995; Salata et al., 2007). Nos leitos ósseos onde não se obtém adequada estabilidade primária dos implantes, um período de cerca de 4 a 6 meses é necessário para que ocorra o processo de osseointegração e o implante seja capaz de suportar cargas mastigatórias (Brånemark et al., 1977). No presente estudo, os implantes foram instalados imediatamente após as extrações dentárias, nos alvéolos frescos, com o objetivo de diminuir o trauma. Todos os implantes apresentaram travamento mecânico apical mínimo de 35N. Nenhum implante apresentou exposição das roscas ao meio bucal no momento da cirurgia, sendo instalados a nível ósseo ou infra-ósseo. A instalação de implantes pela técnica imediata pode ter sido um fator limitante no estudo uma vez que os alvéolos não apresentaram o mesmo diâmetro em todos os casos, ou seja, a formação do “gap” entre a parede óssea remanescente e o implante não foi o mesmo em todas as amostras. Entretanto, em nenhum caso o “gap” na região coronal do implante foi maior do que 2 mm. De acordo com estudos prévios, se o implante é instalado pela técnica imediata com “gap” de até 2 mm, a cicatrização ocorre previsivelmente sem a utilização de procedimentos regenerativos (Covani et al., 2003; Paolantonio et al., 2001). A literatura mostra uma extensa quantidade de trabalhos e revisões sobre biomateriais que visam regeneração óssea alveolar e periimplantar. Dentre as terapias destacam-se o uso de membranas para regeneração óssea guiada, matriz óssea desmineralizada, osso autógeno, hidroxiapatita, cerâmicas bioativas, plasma rico em plaquetas, proteína óssea morfogenética (BMP), fatores de crescimento, células tronco mesenquimais e diversas associações destes biomateriais (Becker et al., 1997; Buser et al., 1995; Salata et al., 2007).

Em relação aos implantes que apresentaram falhas no processo de osseointegração com a formação de tecido fibroso na interface osso-implante, os resultados obtidos confirmam a teoria proposta por Delanian e Lefaix (2004), na qual a radiação induz a fibrose, uma vez que considerando somente o lado controle dos três grupos estudados, não houve nenhum caso de fibrointegração no grupo não irradiado (A), sendo 18,2% no grupo B e 20% no grupo C, embora sem diferença estatística significativa. Considerando o lado experimental, no qual foi utilizada a associação

CTMs-MO+PRP, o percentual de fibrointegração foi 7,7% no grupo não irradiado (A), 25,0% no grupo B e 40,0% no grupo C. Estes resultados, embora diferente nos três grupos em ambos os lados, não apresentou significância estatística, o que indica que o uso da associação CTMs-MO+PRP não interferiu na osseointegração. Estes resultados discordam de estudos anteriores os quais mostraram que o osso neoformado com o uso da associação CTMs+PRP é melhor do que sem o PRP, tanto na instalação de implantes pela técnica convencional (Yamada et al., 2004) quanto pela técnica imediata (Ito et al., 2006), sugerindo uma influência positiva desta associação na regeneração óssea. A premissa sobre o uso do PRP na reparação óssea é baseada na presença de elevado do número de plaquetas, as quais contêm uma variedade de fatores de crescimento como PDGF e TGF- β , podendo ter um impacto significativo sobre a proliferação, regulação e diferenciação das células mesenquimais (Lynch et al., 1991; Marx et al., 1998). Diversos estudos têm demonstrado um efeito positivo do uso do PRP na neoformação óssea (Schlegel et al., 2003; Zechner et al., 2003; Fontana et al., 2004; Kim et al., 2002; Froum et al., 2002; Ocaña, 2010).

A formação do osso envolve uma sequência de eventos tais como a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação dos osteoblastos, processo controlado por uma cascata de eventos regulados por fatores sistêmicos e locais, entre eles fatores de crescimento (Zhang et al., 2009), seguidos pela deposição e mineralização de matriz óssea (Canalis, 1996). Neste estudo, o PRP foi utilizado em conjunto com o botão de CTMs, como carreador e fator de crescimento autólogo para as células indiferenciadas presentes no local, assim como no estudo de Yamada et al. (2004), os quais encontraram diferença estatística significativa entre os grupos controle e experimental (uso de CTMs+PRP) em relação à neoformação óssea, com maior densidade óssea periimplantar no grupo experimental. Os resultados do presente estudo diferem dos de Yamada et al. (2004), uma vez que foi observada uma menor formação óssea na interface osso-implante e um maior número de casos de fibrointegração onde a associação foi utilizada. A presença de leucócitos no concentrado de plaquetas pode constituir o componente responsável pelas variações nas propriedades de PRP (Ehrenfest et al., 2009), uma vez que os leucócitos têm um papel essencial nas fases iniciais de inflamação e também serem responsáveis por aumentar o potencial dos fatores de crescimento (Ehnert et al., 2010), o que pode levar a uma resposta desfavorável, como fibrose no tecido reparador, ao mesmo tempo em que pode inibir a

formação de osso (Arnoczky et al., 2011). Estes dados corroboram com os achados de Balaguer et al. (2010), Giovanini et al. (2010) e Giovanini et al. (2011) os quais também não encontraram efeito positivo do uso do PRP na regeneração óssea. De acordo com Giovanini et al (2010), defeitos ósseos tratados com PRP apresentaram aumento na expressão de colágeno tipo III e tipo I, além de diminuição da mineralização óssea, com formação de tecido de granulação e osso medular, associado ao efeito trombogênico.

Para verificar o melhor momento para a reabilitação oral com implantes osseointegráveis em pacientes oncológicos, os grupos estudados foram comparados em pares. Em relação ao PIP, houve diferença estatística entre os grupos A e C tanto no lado controle ($p=0,010$) como no experimental ($p=0,013$) e entre os grupos B e C ($p=0,020$ no lado controle e $p=0,025$ no lado experimental). Entre os grupos A e B não houve diferença significativa ($p>0,05$). Na comparação dos grupos em pares no parâmetro COI, houve diferença estatística apenas entre os implantes instalados no lado controle dos grupos A e B ($p=0,017$) e nos lados controle ($p=0,033$) e experimental ($p=0,018$) dos grupos A e C. Em relação à DOIR, houve diferença estatística na comparação dos grupos A e B ($p=0,022$) e A e C ($p=0,014$) apenas no lado controle. Estes resultados indicam que em relação à perda de implantes, o melhor momento para reabilitar o paciente com implantes dentários é antes da RT. Apesar disso, os percentuais de COI e DOIR foram reduzidos significativamente nos grupos B e C em relação ao grupo A, indicando um efeito negativo da RT na formação óssea periimplantar mesmo nos animais que receberam a radiação ionizante 15 dias após a instalação dos implantes, embora com resultados melhores que no osso já irradiado.

Embora a instalação de implantes dentários previamente à RT tenha sido indicada quando necessária, é importante ressaltar que quando um osso que contém implantes é submetido à RT, ocorre uma dispersão da radiação ocasionada pelo metal que compõe o implante. Segundo Wang et al. (1998), que realizaram estudo com implantes instalados em mandíbulas artificiais com densidade óssea semelhante à humana, é justamente na interface osso-implante onde há a maior concentração da radiação “espalhada”. Os autores afirmaram que a radiação ionizante interage com os átomos do metal do implante, movimentando e liberando seus elétrons. Por isso, a dispersão da radiação ao redor do implante é maior, o que poderia levar a um aumento de radiação secundária, com maior risco de osteorradionecrose. Neste estudo, a RT realizada 15 dias após a instalação do implante também interferiu de maneira negativa

na osseointegração, com diferença significativa, nos parâmetros COI ($p=0,017$) e DOIR ($p=0,022$) somente no lado controle, quando comparado ao grupo não irradiado.

Além de todas as variáveis analisadas, deve-se levar em consideração que o percentual de contato entre o osso e o implante está em constante modificação, uma vez que a neoformação óssea ao redor do implante é um processo dinâmico. Desta maneira, a quantidade de tecido ósseo periimplantar varia dependendo da região em que o implante foi instalado e do momento da remoção do espécime (Ettinger et al., 1993; Steflik et al., 1994).

Os resultados encontrados relevam também a importância de um planejamento multiprofissional nestes pacientes, com a presença de um cirurgião dentista especializado, capaz de planejar a reabilitação bucal em conjunto com o oncologista e cirurgião de cabeça e pescoço, já que o melhor momento para instalação de implantes dentários nestes pacientes é antes da RT, preferencialmente no mesmo momento cirúrgico da ressecção do tumor, já que os pacientes são operados sob anestesia geral.

Embora com a metodologia empregada neste estudo o uso da associação CTMs-MO+PRP não apresentou nenhum efeito positivo na osseointegração de implantes dentários instalados em alvéolos frescos, foi demonstrado em estudos anteriores que o uso de CTMs-MO, após sua expansão em cultura, e muitas vezes associadas a um carreador, é capaz de regenerar segmentos de osso perdidos após trauma ou doença focal (Bianco; Robey, 2004). Neste sentido, novas investigações devem ser realizadas para esclarecer completamente a relação entre a associação de CTMs-MO+PRP e a osseointegração de implantes dentários.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados demonstram que as CTMs-MO de *Minipigs BR-1* obtidas com o protocolo utilizado neste estudo são células-tronco, uma vez que apresentam morfologia fibroblastóide, marcadores de superfície específicos de CTMs e potencial de diferenciação em linhagens como adipócitos, osteoblastos e condrócitos, podendo ser aplicadas em ensaios pré-clínicos na medicina regenerativa.
- A radiação ionizante interferiu negativamente na osseointegração de implantes instalados tanto pós-RT quanto pré-RT, sendo que após a RT o índice de perda de implante foi aproximadamente três vezes maior que em osso não irradiado e a quantidade de tecido ósseo periimplantar neoformado duas a três vezes menor. Os implantes instalados 15 dias antes da RT apresentaram melhores resultados em relação aos implantes instalados após a RT, sugerindo que este seria o melhor momento para reabilitação bucal com implantes dentários em pacientes que necessitem de RT.
- A associação de CTMs-MO+PRP não apresentou potencial de acelerar ou favorecer a osseointegração dos implantes em nenhum dos grupos estudados. Com a metodologia empregada neste estudo, o uso de CTMs-MO+PRP para preenchimento do alvéolo previamente à instalação de implantes dentários não apresentou nenhum efeito positivo na osseointegração. Embora sem diferença estatisticamente significativa, os casos onde foi utilizada esta associação apresentaram menores percentuais de COI e DOIR, com mais casos de fibrointegração.

8 ANEXO

Dados da análise histomorfométrica

Grupo A – Lado controle

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
A	P1E1L1	1	1	1	60,8	61,9	36,3	57,9	68,5		Não
A	P1E1L2	1	1	2	63,0			79,2			
A	P1E2L1	1	2	1	11,2	36,9		29,8	53,7		Não
A	P1E2L2	1	2	2	62,7			77,6			
A	P1E3L1	1	3	1	0	22		0	23,5	43,1	Não
A	P1E3L2	1	3	2	44,0			47,1			
A	P1E4L1	1	4	1	10,3	24,1		3,1	26,5		Não
A	P1E4L2	1	4	2	38,0			49,9			
A	P2E1L1	2	1	1	36,4	39,6	44,0	41,6	52,45		Não
A	P2E1L2	2	1	2	42,8			63,3			
A	P2E2L1	2	2	1	51,3	48,3		76,3	61,9	57,2	Não
A	P2E2L2	2	2	2	45,3			47,5			
A	P3E1L1	3	1	1	65,2	51,3	34,9	55,2			Não
A	P3E1L2	3	1	2	37,4			39,4			
A	P3E2L1	3	2	1	13,3	20,1		23,0	25,5	39,7	Não
A	P3E2L2	3	2	2	26,9			28,0			
A	P3E3L1	3	3	1	15,6	33,3		17,6	46,2		Não
A	P3E3L2	3	3	2	51,1			74,9			
A	P4E1L1	4	1	1	10,9	20,0	43,3	26,2	32,4		Não
A	P4E1L2	4	1	2	29,2			38,7			
A	P4E2L1	4	2	1	48,4	54,6		55,9	55,9	52,0	Não
A	P4E2L2	4	2	2	60,8			55,9			
A	P4E3L1	4	3	1	77,6	55,2		83,4	67,6		Não
A	P4E3L2	4	3	2	32,8			51,8			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

Grupo B – Lado controle

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
B	P5E1L1	5	1	1	7,6	26,1		15	44,1		Não
B	P5E1L2	5	1	2	44,7			73,2			
B	P5E2L1	5	2	1	29,6	34,4	32,4	39,5	39,7	40,4	Não
B	P5E2L2	5	2	2	39,3			40			
B	P5E3LA	5	3	1	51,8	36,7		62,9	37,3		Não
B	P5E3L2	5	3	2	21,6			11,8			
B	P6E1L1	6	1	1	21,5	25,5		20,3	20,2		Não
B	P6E1L2	6	1	2	29,5			20,1			
B	P6E2L1	6	2	1	13,8	17,8	29,4	12,8	26,0	32,4	Não
B	P6E2L2	6	2	2	21,8			39,2			
B	P6E3L1	6	3	1	42,6	44,9		59,8	51,0		Não
B	P6E3L2	6	3	2	47,3			42,2			
B	P7E3L1	7	3	1	9,2	18,6		51,9	48,1		Não
B	P7E3L2	7	3	2	28,1			44,3			
B	P7E4L1	7	4	1	0	0	9,3	0	0	24,0	Sim
B	P7E4L2	7	4	2	0			0			
B	P8E1L1	8	1	1	0	0		0	0		Sim
B	P8E1L2	8	1	2	0			0			
B	P8E3L1	8	3	1	32	25,6	8,5	48,8	44,7	18,5	Não
B	P8E3L2	8	3	2	19,2			40,6			
B	P8E4L1	8	4	1	0	0		11,8	10,7		Não
B	P8E4L2	8	4	2	0			9,6			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

NOTA: As amostras P5E4, P6E4, P7E1, P7E2 e P8E2 não foram tabuladas pois estes implantes foram perdidos.

Grupo C – Lado controle

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
C	P9E1L1	13	1	1	26,9	28,4	14,2	36,0	35,5		Não
C	P9E1L2	13	1	2	30,0			35,0			
C	P9E2L1	13	2	1	0	0		0	0	17,7	
C	P9E2L2	13	2	2	0			0			
C	P10E1L1	14	1	1	36,0	23,2	25,2	28,9	20,6		Não
C	P10E1L2	14	1	2	10,5			12,2			
C	P10E2L1	14	2	1	14,9	27,1		53,6	46,8	33,7	
C	P10E2L2	14	2	2	39,3			40,0			
C	P11E1L1	15	1	1	2,0	1	1,0	2,2	2,1	2,1	Não
C	P11E1L2	15	1	2	0			2			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

NOTA: As amostras P9E3, P9E4, P10E3, P10E4 e P11E2, P11E3, P11E4, P12E1, P12E2, P12E3 e P12E4 não foram tabuladas pois estes implantes foram perdidos.

Grupo A – Lado experimental

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
A	P1D1L1	1	1	1	13,7	16,7	21,1	14,2	21,0	31,2	Não
A	P1D1L2	1	1	2	19,7			27,8			
A	P1D2L1	1	2	1	24,3	25,4		42,3	41,4		Não
A	P1D2L2	1	2	2	26,5			40,4			
A	P2D1L1	2	1	1	0	0		0	0		Sim
A	P2D1L2	2	1	2	0			0			
A	P2D2L1	2	2	1	74,3	67,2	38,0	87	78,9	46,2	Não
A	P2D2L2	2	2	2	60			70,7			
A	P2D3L1	2	3	1	39,6	46,8		50,4	59,9		Não
A	P2D3L2	2	3	2	53,9			69,3			
A	P3D1L1	3	1	1	22,3	22,4		41,9	45,4		Não
A	P3D1L2	3	1	2	22,4			48,9			
A	P3D2L1	3	2	1	14,5	7,3		15,7	7,9		Não
A	P3D2L2	3	2	2	0			0			
A	P3D3L1	3	3	1	18,4	17,2	13,3	15,3	17,7	19,0	Não
A	P3D3L2	3	3	2	16			20			
A	P3D4L1	3	4	1	12,5	6,3		10,1	5,1		Não
A	P3D4L2	3	4	2	0			0			
A	P4D1L1	4	1	1	37,5	30,0		40	29,9		Não
A	P4D1L2	4	1	2	22,4			19,8			
A	P4D2L1	4	2	1	23,9	37,3		48,1	51,1		Não
A	P4D2L2	4	2	2	50,7			54			
A	P4D3L1	4	3	1	34,2	35,9	37,8	49,9	57,4	49,5	Não
A	P4D3L2	4	3	2	37,5			64,9			
A	P4D4L1	4	4	1	49,8	48,2		55,6	59,8		Não
A	P4D4L2	4	4	2	46,6			63,9			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

NOTA: A amostra P2D4 não foi tabulada pois este implante foi perdido.

Grupo B – Lado experimental

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
B	P5D1L1	5	1	1	17	20,4		26,7	37,0		Não
B	P5D1L2	5	1	2	23,7			47,3			
B	P5D2L1	5	2	1	27,4	13,7	19,7	37,7	18,9	33,3	Não
B	P5D2L2	5	2	2	0			0			
B	P5D4L1	5	4	1	23,8	24,9		28,6	43,9		Não
B	P5D4L2	5	4	2	26			59,2			
B	P6D1L1	6	1	1	18	14,3		18,8	19,8		Não
B	P6D1L2	6	1	2	10,5			20,8			
B	P6D2L1	6	2	1	0	0	27,9	0	0	31,8	Sim
B	P6D2L2	6	2	2	0			0			
B	P6D3L1	6	3	1	79,7	69,4		88,3	75,5		Não
B	P6D3L2	6	3	2	59			62,7			
B	P7D1L1	7	1	1	0	0		0	0		Sim
B	P7D1L2	7	1	2	0			0			
B	P7D2L1	7	2	1	5	4,8		9	6,6		Não
B	P7D2L2	7	2	2	4,5			4,2			
B	P7D3L1	7	3	1	30,5	37,5	12,4	44,3	54,2	19,5	Não
B	P7D3L2	7	3	2	44,4			64,1			
B	P7D4L1	7	4	1	14,6	7,3		34,1	17,1		Não
B	P7D4L2	7	4	2	0			0			
B	P8D1L1	8	1	1	4,5	4,5		20,0	16,1		Não
B	P8D1L2	8	1	2	4,5			12,2			
B	P8D2L1	8	2	1	0	0	2,3	0	0	8,1	Sim
B	P8D2L2	8	2	2	0			0			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

NOTA: As amostras P5D3, P6D4, P8D3 e P8D4 não foram tabuladas pois estes implantes foram perdidos.

Grupo C – Lado experimental

Grupo	Amostra	Porco	Implante	Lado	COI	COI média lados 1 e 2	COI média geral	DOIR	DOIR media lados 1 e 2	DOIR média geral	FI
C	P9D1L1	13	1	1	0	0	1,5	0	0	2,7	Sim
C	P9D1L2	13	1	2	0			0			
C	P9D2L1	13	2	1	4,1	3,1		2,0	5,4		Não
C	P9D2L2	13	2	2	2,0			8,8			
C	P10D1L1	14	1	1	27,7	20,3	16,2	48,0	35,5	26,2	Não
C	P10D1L2	14	1	2	12,9			23,0			
C	P10D2L1	14	2	1	15,5	12		20,2	17,0		Não
C	P10D2L2	14	2	2	8,5			13,7			
C	P11D1L1	15	1	1	0	0	0	0	0	0	Sim
C	P11D1L2	15	1	2	0			0			

Legenda: COI: contato osso-implante; DOIR: densidade óssea no interior da rosca; FI: fibrointegração

NOTA: As amostras P9D3, P9D4, P10D3, P10D4, P11D2, P11D3, P11D4, P12D1, P12D2, P12D3 e P12D4 não foram tabuladas pois estes implantes foram perdidos.

REFERÊNCIAS¹

1. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998;139(2):663-70.
2. Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson H, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for insuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52(2):155-70.
3. Albrektsson T, Zarb GA, Worthington, P. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986;1(1):11-25.
4. Albrektsson T, Lekholm U. Osseointegration: current state of the art. *Dent Clin North Am*. 1989;33(4):537-54.
5. Albrektsson T, Sennerby L. Direct bone anchorage of oral implants, clinical and experimental considerations on the concept of osseointegration. *Int J Prosthodont*. 1990;3(1):30-41.
6. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001;10(2):96-101.
7. Alsaadi G, Quirynen M, Michiles K, Teughels W, Komarek A, Van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. *J Clin Periodontology*. 2008;35(1):51-7.
8. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007;6(5):593-7.
9. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA: What is platelet-rich plasma? *Operat Tech Sports Med*. 2011;19:142-148.
10. Asikainen P, Klemetti E, Kotilainen R, Vuillemin T, Sutter F, Volpio HM, Kulaa A. Osseointegration of dental implants in bone irradiated with 40, 50 or 60 Gy doses. An experimental study with beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9(1):20-5.
11. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Experimental Hematology*. 2000;28(6):707-15.
12. Barzilay I, Graser GG, Iranpour B, Natiella JR, Proskin HM. Immediate implantation of pure titanium implants into extraction sockets of *Macaca fascicularis*. Part II: Histologic observation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(4):489-97.
13. Barzilay I. Immediate Implants: their current status. *Int J Prosthodont*. 1993;6(2):169-75.

---

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

14. Becker W, Becker BE, Israelson H, Lucchini JP, Handelsman M, Ammons W, Rosenberg E, Rose L, Tucker LM, Lekholm U. One-step surgical placement of branemark implants: a prospective multicenter clinical study. *The international journal of oral & maxillofacial implants*. 1997;12(4):454-62.
15. Berger AM, Kilroy TJ. Oral Complications. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 2004;7(2):2884-92.
16. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. A model study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251-62.
17. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cell. In: Lanza RP. *Handbook of Adult and Fetal Stem Cells*. EUA: Academic Press, San Diego, CA, p. 415-24, 2004.
18. Boyapati L, Wang HL. The role of platelet- rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent*. 2006;15(2):160-70.
19. Boÿum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
20. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I: experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.
21. Brånemark P-I, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallen O, Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977;16:1-132.
22. Brånemark R, Öhrnell LO, Skalak R, Carlsson L, Brånemark P-I. Biomechanical characterization of osseointegration: An experimental in vivo investigation in the beagle dog. *J Orthop Res*. 1998;16(1):61-9.
23. Brogniez V, D'Hoore W, Grégoire V, Munting E, Reychler H. Implants Placed in an Irradiated Dog Mandible: A Morphometric Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(4):511-518.
24. Brunski JB, Puelo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15(1):15-46.
25. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int j periodontics restorative dent*. 1995;15(1):10-29.
26. Buser D, Mericske-Stern R, Dula K, Lang NP. Clinical experience with one-stage, non-submerged dental implants. *Adv Dent Res*. 1999;13:153-61.
27. Bustad LK. Use of pigs in biomedical research. *Nature*. 1965;208(5010):531-5.
28. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31(1):25-35.

29. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076-84.
30. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009; 217(2):318-24.
31. Carvalho ACC, Goldenberg RCS. Células-tronco Mesenquimais: Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.
32. Casado JG, Gomez-Mauricio G, Alvarez V, Mijares J, Tarazona R, Bernad A, Sanchez-Margallo FM. Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012;147:104-12.
33. Celik N, Wei FC, Chen HC, Cheng MG, Huang WC, Tsai FC, Chen YC. Osteoradionecrosis of the mandible after oromandibular cancer surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(6):1875-81.
34. Chang SCN, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, Chen PKT, Tai CL, Lou J. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(7):841-50.
35. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
36. Crigler L, Kazhanie A, Yoon TJ, Zakhari J, Anders J, Taylor B, Virador VM. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. *FASEB J.* 2007;21(9):2050-63.
37. Curi MM; Kowalski LP. Osteoradionecrosis of the mandible and maxilla. *Revista brasileira de cirurgia de cabeça e pescoço.* 2003;31(2):49-53.
38. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204-13.
39. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998;11(5):391-401.
40. Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol.* 2004;73(2):119–31.
41. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-43.
42. Dominici M, Le Blanc K, Muller E, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

43. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage–Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11:318–26.
44. Ehnert S, Baur J, Schmitt A, Neumaier M, Lucke M, Dooley S, Vester H, Wildemann B, Stockle U, Nusller AK. TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One.* 2010;5(11):e14073.
45. Ehrenfest DM, Rasmuson L, Albrektsson T: Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet- rich fibrin (LPRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167.
46. Ettinger RL, Spivey JD, Han D-H, Koorbusch G. Measurement of the interface between bone and immediate endosseous implants: A pilot study in dogs *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993;8(4):420-7.
47. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II): etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(3):721-64.
48. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002;22(1):45-53.
49. Gal TJ, Munoz-Antonia, Muro-Cacho C, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro. A potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(9):1124-8.
50. Garcia RV, Gabrielli MA, Hochuli-Vieira E, Spolidorio LC, Filho JG, Neto FA, de Cardoso LA, Shibli JA. Effect of Platelet-Rich Plasma on Peri-Implant Bone Repair: A Histologic Study in Dogs. *J Oral Implantol.* 2010;36(4):281-90.
51. Giovanini AF, Deliberador TM, Gonzaga CC, de Oliveira Filho MA, Gohringer I, Kuczera J, Zielak JC, de Andrade Urban C. Platelet-rich plasma diminishes calvarial bone repair associated with alterations in collagen matrix composition and elevated CD34⁺ cell prevalence. *Bone.* 2010;46(6):1597-1603.
52. Giovanini AF, Gonzaga CC, Zielak JC, Deliberador TM, Kuczera J, Goringher I, de Oliveira Filho MA, Baratto-Filho F, Urban CA. Platelet-rich plasma (PRP) impairs the craniofacial bone repair associated with its elevated TGF- β levels and modulates the co-expression between collagen III and alpha-smooth muscle actin. *J Orthop Res.* 2011;29(3):457-463.
53. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5):362-9.
54. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(36):6052–63.
55. Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets.* 2004;15(1):29-35.

56. Guo SQ, Xu JZ, Zou QM, Jiang DM. Immunological Study of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells during Bone Formation. *J Int Med Res.* 2009; 37(6):1750-9.
57. Huh JY, Choi BH, Zhu SJ, Jung JY, Kim BY, Lee SH. The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101(4):426-31.
58. Ihde S, Kopp S, Gundlach K, Konstantinovic VS. Effects of radiation therapy on craniofacial and dental implants: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(1):56-65.
59. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. 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.* 2006;17(5):579-86.
60. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
61. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev.* 2002;28(1):65-74.
62. Johansson CB, Albrektsson T. A removal torque and histomorphometric study of commercially pure niobium and titanium implants in rabbit bone. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(1):24-9.
63. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Xu XL, Yu XJ. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2006;30(7):569-75.
64. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials.* 2008;29(29):3983-92.
65. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HS. A comparative study of osseointegration of HAVANA implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(9):1018-25.
66. Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng.* 2007;13(6):1135-50.
67. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh H, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone,* 2007;40(2):522-8.
68. Krause, DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001;105(3):369-77.

69. Kwan DM, Wan DC, Longaker MT. Skeletal-Tissue Engineering. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of Tissue Engineering. San Diego: Elsevier Academic Press, 935-44, 2007.
70. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007;262(5):509-25.
71. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-75.
72. LeGeros RZ; Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J Bone Mineral Res*. 1993; 8(2):S583-96.
73. Linder L. Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1989;60(2):129-34.
74. Lukash FM, Sachs SA. Functional mandibular reconstruction: Prevention of the oral invalid. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(2):227-33.
75. Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 1991;62(7):458-467.
76. Man Y, Wang P, Guo Y, Xiang L, Yang Y, Qu Y, Gong P, Deng L. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. *Biomaterials*. 2012;33(34):8802-11.
77. Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1:31-37.
78. Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o Minipig br1. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003;18(5):387-91.
79. Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;64(4):379-90.
80. Marx RE. Histomorphometric examination of healing around hydroxylapatite implants in 60Co-irradiated bone. Discussion. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994;52(2):172-3.
81. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Giordano KR. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(6):638-46.
82. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-96.
83. McGregor AD, Macdonald DG. Post-irradiation changes in the blood vessels of the adult human mandible. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995;33(1):15-8.
84. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*. 2008;22(6):432-38.

85. Melton DA, Cowen C. Stemness: Definition, Criteria, and Standards. In: Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, Thomson J, Wilmot SI. (eds.). *Essentials of stem cell biology*. Oxford: Academic Press, 2009.
86. Moy, PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. 2005;20(4):569-77.
87. Murray CG, Herson J, Daly TE, Zimmerman S. Radiation necrosis of the mandible: A 10-year study. Part II. Dental factors, onset, duration and management of necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1980;6:549-53.
88. Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From AH, Zhang J. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(3):612-20.
89. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177(4):2080-7.
90. Niemeyer P, Schönberger TS, Hahn J, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp N, Alexander T, Mehlhorn AT, Milz S, Pearce S. Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration. *Tissue engineering: Part A*. 2009;16(1):33-43.
91. Niewald M, Fleckenstein J, Mand K, Holtmann H, Spitzer WJ, Rube C. Dental status, dental rehabilitation procedures, demographic and oncological data as potential risk factors for infected osteoradionecrosis of the lower jaw after radiotherapy for oral neoplasms: a retrospective evaluation. *Radiat Oncol*. 2013;8(1):227.
92. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*. 2002; 20(5):1060-9.
93. Ocaña RP. Avaliação da interface osso-implante em tíbias de coelho irradiadas. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente].
94. Oltramari PVP, Navarro RL, Henriques JFC, Capelozza ALA, Granjeiro JM. Dental and skeletal characterization of the BR-1 minipig. *Vet J*. 2007;173(2):399-407.
95. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res*. 2002;91(12):1092-102.
96. Paolantonio M, Dolci M, Scarano A, D'Archivio D, Di Palcido G, Vincenzo T, Piattelli A. Immediate Implantation In fresh Extraction Sockets. A Controlled Clinical and Histological Study in Man. *J Periodontol*. 2001;72(11):1560-71.
97. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, Bassi M, Donatti D, Marchetti C. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol*. 2008;35(6):539-46.

98. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Marchetti C. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(2):265-72.
99. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
100. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004;95(1):9-20.
101. Plánka L, Necas A, Srnc R, Rauser P, Stary D, Jancár J, Amier E, Filová E, Hlucilová J, Kren L, Gál P. Use of Allogenic Stem Cells for the Prevention of Bone Bridge Formation in Miniature Pigs. *Physiol Res.* 2009;58(6):885-93.
102. Ranly DM, Lohman CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(1):139-147.
103. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moreta PM, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis VF, Amaral PS, Brofman S, Goldenberg LS, Nakao AND, Correa A, Strutt B, Khalil W, Killinger D. Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. *Exp Biol Med.* 2008; 233(7):901-13.
104. Renou SJ, Guglielmotti MB, Torre A, Cabrini RL. Effect of total body irradiation on peri-implant tissue reaction: an experimental study. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12(5):468-72.
105. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittinger M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307:321-27.
106. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells.* 2003;21(1):105-10.
107. Rothwell BR. Prevention and treatment of the orofacial complications of radiotherapy. *J Am Dent Assoc.* 1987;114(3):316-22.
108. Rossi Júnior R, Leme JJ, Pispico R. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos: proposta de um protocolo de obtenção simplificado. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2001;33(1):5-7.
109. Rossi Júnior R, Souza Filho MAP. Uso de trombina autógena em plasma rico em plaquetas. Proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução clínica. *Rev Pau Odontol.* 2004;26(5):4-9.
110. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeronché V, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005;85(8):962-71.

111. Salata LA, Burgos PM, Rasmusson L, Novaes AB, Papalexiou V, Dahlin C, Sennerby L. Osseointegration of oxidized and turned implants in circumferential bone defects with and without adjunctive therapies: an experimental study on BMP-2 and autogenous bone graft in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007;36(1):62-71.
112. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL. Radioterapia em oncologia. Rio de Janeiro, RJ: Medsi; 1999.
113. Schiodt M, Hermund NU. Management of oral disease prior to radiation therapy. *Support Care Cancer.* 2002;10(1):40-3.
114. Schlegel KA, Kloss FR, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Wiltfang J. Bone conditioning to enhance implant oseointegration: An experimental study in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(4):505–11.
115. Schweiger JW. Titanium implants in irradiated dog mandibles. *J Prosthet Dent.* 1989;62(2):201-5.
116. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(3):191-9.
117. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006;107(4):1484-90.
118. Steflik DE, Lake FT, Sisk AL, Parr GR, Hanes PJ, Davis HC, Adams BO, Yavari J. A comparative investigation in dogs: 2-year morphometric results of the dental implant-bone interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11(1):15-25.
119. Stentz WC, Mealey BL, Nummikoski PV, Gunsolley JC, Waldrop TC. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Histologic analysis. *Journal of Periodontology.* 1997;68(10):933-49.
120. Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107(7):929-34.
121. Strauer BE, Brehm M, Schannewell CM. The therapeutic potential of stem cells in heart disease. *Cell Prolif.* 2008;41(1):126-45.
122. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
123. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current applications in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med.* 2009;234(1):1-9.
124. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: Clinical characteristics and relation to the field of irradiation, *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(10):1088-93.

125. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1626-33.
126. Tumbleson ME. Swine in biomedical research. New York: Plenum Press; 1986.
127. Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):194-201.
128. Verdonck HWD, Meijer GJ, Laurin T, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, Stoelinga PJW, de Baat C. Implant stability during osseointegration in irradiated and non- irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(2):201–6.
129. Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sanchez-Guijo FM, Alberca M, Pérez-Simon JA, San Miguel JF, Del Cañizo MC. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2004;89(12):1421-7.
130. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):213-25.
131. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol.* 2006;109(1):74-81.
132. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, Ueda M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(10):1699-707.
133. Zechner W, Tangl S, Tepper G, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:15-22.
134. Zhang L, Wang P, Mei S, Li C, Cai C, Ding Y. In vivo alveolar bone regeneration by bone marrow stem cells/fibrin glue composition. *Archives of Oral Biology.* 2012;57(3): 238–44.
135. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.

APÊNDICE

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
cep@up.edu.br

PROTOCOLO Nº 001 /2009

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UP)

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Avaliação da interface osso/implante em mandíbula de miniporcoss irradiados e o uso de células tronco na osseointegração.
2. Professor orientador: Laurindo Moacir Sassi
3. Aluno(s) envolvido(s): Roberta Stramandinoli
4. Instituição do pesquisador: Universidade Positivo
5. Local onde será realizada a pesquisa: Centro Cirúrgico Experimental da Universidade Positivo e Hospital Erasto Gaertner

OBJETIVO
Avaliar a ação da radioterapia no processo de osseointegração de implantes dentais. Avaliar a influência do uso de células tronco (osso bovino inorgânico liofilizado e/ou células tronco) na osteogênese do alvéolo pós exodontia e pré-instalação implantes dentários em miniporcoss submetidos à radioterapia.

SÍNTESE DO PROJETO
8. Serão utilizados 12 porcos da raça <i>minipig BR</i> , todos do sexo masculino, com peso entre 18 e 20 kgs e com cerca de 5 meses de idade. Durante todo o experimento, os animais serão mantidos nas dependências do biotério da Universidade Positivo em condições controladas de luz e temperatura, recebendo água e ração <i>ad libitum</i> . Os procedimentos cirúrgicos serão realizados no Laboratório de Técnica Operatória da Universidade Positivo. Os animais serão divididos em 3 grupos de 4 porcos de acordo com o alvéolo preenchido após a extração dentária. Os alvéolos serão preenchidos com: somente com sangue; sangue e osso bovino inorgânico (OBIL); OBIL associado a células tronco e somente com células tronco. Remoção e preparo das células tronco. Será realizada uma incisão, com lâmina 15, cerca de 5 cm posterior a base do crânio ao longo da linha dorso medial no sentido craniocaudal com tamanho de aproximadamente 2 a 3 mm. Apenas os animais dos grupos B e C serão submetidos à radioterapia na região de mandíbula, bilateralmente, porém em momentos diferentes. A dose total de irradiação para cada lado da mandíbula será de 27 Gy, fracionada em três doses de 9 Gy, com intervalo de sete dias para cada dose. A radioterapia será realizada no Serviço de Radioterapia do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba/Pr.

COMENTÁRIOS DO RELATOR
9. As justificativas sobre a proveniência dos animais, número de animais por grupo, controle da dor pós-operatória e hipóteses da pesquisa são satisfatórias. Comentário sobre a <u>técnica anestésica</u> : uma vez que o Isoflurano será empregado como anestésico inalatório para manutenção do plano anestésico, recomenda-se a intubação orotraqueal. Portanto, não se pode afirmar que a intubação orotraqueal não será necessária, visto que oferece mais segurança e qualidade anestésica. Comentário sobre o <u>método de eutanásia</u> : não é possível provocar parada cardiorrespiratória com injeção de 10mg/Kg de Halotano. As normas internacionais sugerem injeção endovenosa rápida de barbitúrico, nesse caso, o Tiopental é uma alternativa.

PARECER FINAL		
☒ Recomenda a aprovação	☐ Não recomenda a aprovação	☐ Em pendência

MARIA FERNANDA TORRES
COORDENADORA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ao
Departamento de Radiologia

PROTÓCOLO:
Recebido por:
Data: 8/12/09

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 26/11/2009, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº 1235/09, intitulado: **"AVALIAÇÃO DA INTERFACE OSSO/IMPLANTE EM MANDÍBULA DE MINIPORCOS IRRADIADOS E O USO DE BIOMATERIAIS NA OSSEOINTEGRAÇÃO"**.

No que tange sua parte empírica será desenvolvido na **UNIVERSIDADE POSITIVO**, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 18/05/2009.

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. ROGER CHAMMAS**

Pesquisador (a) Executante: **ROBERTA TARGA STRAMANDINOLI ZANICOTTI**

CAPPesq, 26 de novembro de 2009.

Prof. Dr. Roger Chammas
Chefe do Depto. de Radiologia
FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Curitiba, 09 de Março de 2010.

Roberta Targa Stramandinoli
Pesquisadora Responsável

Prezada Pesquisadora,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: **“Avaliação da interface osso/implante em mandíbula de miniporcos irradiados e o uso de células tronco na osseointegração.”**, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1978** e tem como pesquisador responsável V. Sa., foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa foi avaliado dia 09 de Março de 2010 e **foi aprovado**, sem restrições.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do Comitê de
Ética em Pesquisa
HGG - L.P.C.C. - CRM-PR 14.457

Membros do CEP:

Andrei Leite de Moraes - Médico
Ariovaldo Donizetti de Abreu - Fisioterapeuta
Clarice Nana Yamanouchi - Médica
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira
Fabrício Martinelli de Oliveira - Médico
Flávia Martignago - Nutricionista
Geovana Cristina S. Sylvestre - Enfermeira
Iolanda de Assis Galvão

Jordan Zanetti Silva - Médico
Jose Carlos Wiederkehr - Administrador de Empresas
Luiz Antonio Negrão Dias - Médico
Márcia Bobak - Enfermeira
Marina Lopes Carlos - Nutricionista
Ricardo Isaías Testoni - Enfermeiro
Rodrigo Leite de Moraes - Médico
Timóteo Borges de Campos - Membro da comunidade.

11/03/10