

UNIVERSIDADE POSITIVO

MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA CLÍNICA

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO ENXERTO DE TECIDO
ADIPOSO NO REPARO DE DEFEITOS DE DEISCÊNCIA AO REDOR
DE IMPLANTES DENTÁRIOS EM TÍBIAS DE COELHOS**

FERNANDA MISSAO BRUGIN MATSUBARA

Dissertação apresentada à Universidade Positivo
para como requisito parcial para obtenção o título
de Mestre em Odontologia, pelo programa de
Mestrado Profissional em Odontologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban
Co-orientador: Prof. Dr. Tatiana Miranda Deliberador

CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da Universidade Positivo- Curitiba – PR

M434 Matsubara, Fernanda Missao Brugin.

Avaliação histomorfométrica do enxerto de tecido adiposo no reparo de defeitos de deiscência ao redor de implantes dentários em tíbias de coelhos / Fernanda Missao Brugin Matsubara. — Curitiba : Universidade Positivo, 2010.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Positivo, 2010.

Orientador : Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban.

1. Implantes dentários osseointegrados. 2. Ossos – Regeneração. I. Título.

CDU 616.314-089.843



Programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de junho de 2010, considerou a candidata **FERNANDA MISSAO BRUGIN MATSUBARA** aprovada.

PROF. DR. CÍCERO DE ANDRADE URBAN

PROF. DR. JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES

PROF. DR. ALLAN FERNANDO GIOVANINI

DEDICATÓRIA

A Deus por tudo o que sou, por todos os ensinamentos colocados em minha vida. Sou felizmente grata pelas pessoas presentes ou que fizeram parte da minha vida, me proporcionando momentos mágicos de alegrias, sonhos, aprendizado, incentivos e vitórias. Agradeço por conduzir o meu caminho sempre da melhor forma e com o maior cuidado, me presenteando com situações inesperadas que muitas vezes não entendidas, mas sempre positivas. Agradeço por me abençoar e me proteger, tornando a minha vida maravilhosa.

Aos meus pais Augusto e Cristina, por me acompanharem e me mostrarem a importância de viver com amor, ética, alegria e sabedoria. Por estarem ao meu lado e conduzirem os meus passos com toda a dedicação e amor. Amo vocês eternamente.

Aos meus irmãos Marcelo e Fábio por nossa cumplicidade e amor inigualável. Por me ensinarem os bons valores da vida e também me proporcionarem momentos fantásticos. Vocês são meus grandes amigos.

Aos meus avós que estão presentes em minha memória como lembranças e em meu coração. Amo muito vocês e agradeço por tudo que fizeram por mim.

Ao meu amor Gustavo, que com seu olhar e sorriso me mostra como a vida é maravilhosa. Agradeço por todo o apoio e incentivo em tudo que faço.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos...

Ao professor, doutor e orientador Cícero de Andrade Urban e a professora, doutora e co-orientadora Tatiana Miranda Deliberador. Sou grata pela enorme dedicação, apoio, ensinamento, paciência e amizade. Pela exaustiva presença em todas as etapas até a conclusão da pesquisa e pelas palavras de incentivo.

Agradeço ao professor e doutor Edson Alves de Campos pelos seus ensinamentos e por colaborar com as fotos do trabalho prático.

Agradeço ao professor e doutor Allan Fernando Giovanini pela sua dedicação e colaboração durante a realização da pesquisa.

Agradeço ao professor e doutor João César Zielak pela ajuda e incentivo durante o mestrado.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares pelo apoio e carinho.

Agradeço de forma muito especial a professora e doutora Maria Fernanda Torres pela dedicação e incentivo no decorrer de todo o trabalho.

Ao meu colega de Mestrado Diogo Godoy Zanicotti. Por sua presença, amizade e ajuda durante todo o mestrado.

Agradeço aos meus professores e mestres do Programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica.

Agradeço a todos os meus colegas de mestrado.

Agradeço a amiga de mestrado Tatiana Bindo, por sua amizade.

Sirlei, Wanderlei e Jéssica, que estiveram presentes em grande parte do período experimental.

Márcio, Adriano e Marcos, pela atenção durante a etapa de desgaste das peças.

Agradeço a empresa de implantes Systhex pela colaboração em doar os implantes e a empresa Genius-Baumer pela doação das membranas utilizadas na parte experimental.

Agradeço ao técnico de laboratório Gilmar da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp.

EPÍGRAFE

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

Matsubara FMB. Avaliação histomorfométrica do enxerto de tecido adiposo no reparo de defeitos de deiscência ao redor de implantes dentários em tíbias de coelhos. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2010.

RESUMO

A ocorrência de deiscência óssea na parede vestibular é um achado freqüente quando se instala implantes dentários imediatos ou não. Entre as técnicas cirúrgicas propostas na literatura estão a utilização da Regeneração Óssea Guiada (ROG) e o uso de enxertos ósseos para tratar estes tipos de defeitos ósseos. Uma opção para o tratamento de deiscências é o possível uso de células-tronco adultas oriundas de tecido adiposo devido à sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células musculares. O objetivo do presente trabalho foi avaliar histomorfometricamente o reparo ósseo de deiscências, criados cirurgicamente ao redor de implantes e tratados com osso autógeno e enxerto de tecido adiposo. Defeitos ósseos mimetizando deiscências periimplantares de 3 mm de largura e 5 mm de altura foram criados em tíbias de 18 coelhos, seguido da instalação de implantes de 3,3 mm × 8,5 mm. Após 90 dias por meio de análise histológica e histomorfométrica foi mensurada a porcentagem de contato osso-implante e a área óssea dentro dos limites das roscas dos implantes. Diferenças foram observadas somente nos resultados do percentual de contato osso-implante. Os grupos do tecido adiposo (TA) e do grupo controle (C) foram similares, enquanto o grupo do osso autógeno (OA) teve um maior percentual de contato, com diferença estatística significativa. Pode-se concluir que o osso autógeno (OA) apresentou melhores resultados e no grupo do tecido adiposo (TA) houve uma heterogeneidade, houve grandes áreas de osso medular mas também haversianas.

Palavras Chave: tecido adiposo, regeneração óssea, implantes dentários.

Matsubara FMB. Histomorphometric evaluation of adipose tissue graft in the repair of dehiscence defects around dental implants in the rabbits tibiae. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2010.

ABSTRACT

The occurrence of bone dehiscence of the buccal wall is a frequent outcome during immediate or not immediate dental implants installation. Among literature surgical techniques, the guided bone regeneration (GBR) and various bone grafts are described in the treatment of this type of defect. Another option for the treatment of bone dehiscence may seem to be the application of stem cells from adipose tissue, due to their ability to differentiate into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and muscle cells. The objective of this present research was to assess by histomorphometry the repair of bone dehiscence surgically created around dental implants placed in the rabbit tibiae, and treated with bone autograft or adipose tissue autograft. Surgical bone dehiscences of 3 mm width and 5 mm height were created after the perforation for the installation of 3.3 mm × 8.5 mm dental implants, at the right and left tibiae of 18 animals. Randomized treatments of blood clot (C), bone (OA) and adipose tissue (TA) autografts were applied. The groups of adipose tissue (TA) and the control group (C) were similar, while the autogenous bone group (OA) had an increase in the percentage of contact, with statistically significant differences. It can be concluded that autogenous bone (OA) had better results and in the TA group there was a heterogeneity, with large areas of a medullary bone and also a haversian one.

Key words: adipose tissue, bone regeneration, dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acesso venoso pela veia marginal da orelha.	21
Figura 2. Máscara para a inalação do Isoflurano.	22
Figura 3. Perfuração final após a utilização da sequência de brocas indicada pelo fabricante.	23
Figura 4. Colocação do implante no defeito criado cirurgicamente.	24
Figura 5. Remoção do tecido adiposo com a utilização de pinça e de tesoura.	25
Figura 6. Posicionamento da membrana e do tecido adiposo recobrando o defeito ósseo.	26
Figura 7. Remoção óssea após a utilização da broca trefina.	27
Figura 8. Tubos de ensaio no dissecador.	29
Figura 9. Vedamento dos tubos de ensaio.	29
Figura 10. Peça após o corte na máquina.	30
Figura 11. Peça fixada no bloco de baquelite.	30
Figura 12. Ilustração esquemática dos parâmetros histomorfométricos analisados	31
Figura 13. Fotomicrografias demonstrando medida linear do contato osso-implante e reconstrução das imagens em filtro	34
Figura 14. Gráfico Box plot demonstrando valores percentuais da medida linear entre osso-implante	36
Figura 15. Fotomicrografias da área óssea total nos limites das roscas do implante	37
Figura 16. Gráfico Box plot demonstrando valores percentuais da área óssea neoformada.	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Defeito ósseo, regeneração óssea e materiais de enxertia óssea	3
2.2. Tecido adiposo e células-tronco mesenquimais	9
3. PROPOSIÇÃO	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Protocolo anestésico	21
4.2. Procedimentos cirúrgicos	22
4.3. Controle do pós-operatório e eutanásia	27
4.4. Remoção dos blocos ósseos	28
4.5. Processamento histológico das peças	28
4.6. Análise histomorfométrica	30
4.7. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Percentual de contato osso-implante	33
5.2. Área de tecido ósseo neoformado no limite da rosca do implante dentário	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO 1	50
ANEXO 2	51

1. INTRODUÇÃO

Defeitos de deiscência, fenestração e outros tipos de defeitos ósseos periimplantares são achados comuns durante a instalação de implantes dentários.

Nesses casos pode-se utilizar procedimentos que visam recuperar a quantidade e a qualidade óssea da área, como a técnica da Regeneração Óssea Guiada (ROG), o uso de biomateriais ou enxertos ósseos. Para promover a ROG, pode-se utilizar membranas absorvíveis ou não-absorvíveis, em associação com uma variedade de materiais de enxerto como o osso autógeno, alógenos, xenógenos e materiais aloplásticos (Chiapasco e Zaniboni, 2009).

Uma nova alternativa de tratamento é a utilização de enxerto de tecido adiposo. Esta é uma fonte de células-tronco mesenquimais (CTMs) com potencial para engenharia tecidual. Caracterizam-se por apresentar uma taxa elevada de amplificação e potencial de diferenciação em linhagens de tecido mesenquimal incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão, músculo (Weinzierl *et al.*, 2006).

A obtenção do tecido adiposo em modelo experimental pode ser facilmente obtida devido ao acesso e a quantidade desse tecido em dorso de coelhos brancos como proposto no estudo de Torres *et al.*(2007). O tecido adiposo como material para promover o reparo ósseo está sendo pesquisado em modelo experimental. No entanto, não há relatos do uso deste tecido no tratamento de fenestrações e deiscências ósseas ao redor de implantes dentários.

Assim, o objetivo deste estudo foi de avaliar o reparo ósseo por meio da verificação histomorfométrica do contato osso-implante após o período de 90 dias de cirurgia, em que foram realizados os tratamentos de enxertia com o tecido adiposo e osso autógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Defeito ósseo, regeneração óssea e materiais de enxertia óssea

Podem ocorrer algumas situações no que se refere a perda óssea durante a instalação dos implantes dentários ou no mesmo momento da preparação óssea do sítio receptor de implantes. Dentre elas, a presença de diferentes tipos de defeitos ósseos periimplantares. Os defeitos deiscência ou fenestração da parede óssea podem ocorrer, além dos problemas anteriormente citados, mas também como consequência de extração dentária (Casati *et al.*, 2002; Araujo e Lindhe, 2005).

Diferentes procedimentos cirúrgicos e diversos materiais podem ser utilizados para alcançar o reparo ósseo como é o caso da Regeneração Óssea Guiada (ROG). Essa técnica utiliza barreiras para criar um espaço ao redor dos defeitos permitindo a regeneração óssea sem a competição de outros tecidos (Casati *et al.*, 2002).

Moses *et al.* (2005), relataram após o estudo em pacientes, que as membranas podem ser utilizadas antes, durante ou após a instalação de implantes dentários. Os autores tiveram o intuito de verificar a resposta óssea cicatricial óssea e de tecido mole em defeitos de deiscência vestibular de várias dimensões ao redor de implantes. Foram utilizados 2 grupos de membranas de colágeno (Ossis® e Bio-Gide®) e 1 de politetrafluoretileno expandido reforçado com titânio (e-PTFE), Gore-Tex®. Os implantes foram instalados, seguido da inserção do material de enxerto ósseo (osso autógeno misturado com osso bovino mineral) e posteriormente a colocação da membrana. Na maioria houve exposição prematura da membrana. Durante a cirurgia e no segundo estágio cirúrgico foram realizadas as medidas da altura e da largura do defeito ósseo. Quando vários implantes foram instalados simultaneamente foram realizadas as médias de altura e largura. Os resultados encontrados

pelos autores não tiveram diferenças estatísticas significantes na redução da área do defeito que teve uma porcentagem média de $92,2 \pm 13,78\%$ no grupo Ossis®; $94,6 \pm 6,69\%$ no grupo Bio-Gide® e $97,3 \pm 4,91$ no grupo da membrana de e-PTFE. A redução da altura foi de $81,6 \pm 23,19\%$; $85,4 \pm 12,26\%$ e $93,4 \pm 9,39\%$, respectivamente. Houveram diferenças estatisticamente significantes nos grupos em que houve exposição prematura da membrana. Com exposição prematura da membrana os resultados foram de $91,5 \pm 10,86\%$ no grupo Ossis®; $71,5 \pm 8,61\%$ Bio-Gide® e $73,7 \pm 13,97\%$. No que se refere à redução do defeito em altura, nos casos em que apresentam exposição da membrana, foi respectivamente de $76,4 \pm 18,28\%$; $53,4 \pm 9,86\%$ e $49,4 \pm 11,05\%$. Após a verificação morfométrica pôde-se concluir que as exposições prematuras das membranas usadas em ROG e dos implantes resultaram em diminuição da formação óssea. Deve-se considerar que as membranas de colágeno pareceram capazes de servir de suporte para a cicatrização gengival, mesmo com exposição da membrana, sendo sua utilização muito vantajosa em procedimentos de ROG.

Hassan *et al.* (2008), verificaram os resultados do reparo ósseo em 2 grupos de pacientes. O primeiro grupo recebeu o implante dentário imediato e juntamente a enxertia com osso autógeno, que foi coletado durante a preparação do sítio do implante e o segundo grupo recebeu o implante juntamente com o biomaterial sintético (Polímero de ácido poliglicólico polilático absorvível sintético). Em situações em que o defeito ósseo era de deiscência vestibular foram utilizadas membranas não-absorvíveis. Foram realizadas as radiografias periapicais em 3, 6, 9 e 12 meses após a cirurgia para a análise dos resultados por meio da densidade em pixels, em todas essas fases do estudo. As imagens radiográficas foram digitalizadas num *scanner* em 600 dpi, foram posteriormente salvas no formato TIFF e a densidade óssea foi mensurada por meio de um programa de análise de imagens. Os resultados encontrados no grupo em que foi utilizado o osso autógeno em 3 meses (em pixels)

foram de $101,49 \pm 10,28$, enquanto no grupo de 12 meses foi de $129,56 \pm 10,29$. No grupo em que foi utilizado o biomaterial sintético os resultados encontrados foram de $92,89 \pm 16,32$ em 3 meses enquanto que em 12 meses foi de $107,66 \pm 13,13$. Houveram diferenças estatísticas significantes em 6, 9 e 12 meses. No grupo em que foi utilizado o osso autógeno houve uma diminuição na perda óssea marginal quando comparado com os resultados encontrados no grupo em que foi utilizado material sintético, devido a capacidade do osso autógeno em manter a estrutura óssea e a atividade osteogênica.

Materiais xenógenos podem ser uma alternativa quando se pretende regenerar tecido ósseo. Siciliano *et al.* (2009), em um estudo clínico de 12 meses em 30 implantes dentários, observaram a regeneração óssea na deiscência da parede vestibular em locais cicatrizados e não cicatrizados. Utilizaram como grupo teste os molares em que foram realizadas as extrações dentárias associadas com o defeito ósseo vestibular ($\geq 3\text{mm}$ de altura e largura), seguida da instalação do implante. Os defeitos ósseos marginais entre os implantes e as paredes ósseas internas foram tratados com partículas de osso bovino desmineralizado associado à membrana colágena absorvível. O grupo controle foi nas regiões dos molares sem defeito ósseo vestibular, com cicatrização de 6 meses após a extração para posterior instalação dos implantes em locais cicatrizados. Os resultados encontrados foram estatisticamente significantes, sendo que em locais cicatrizados o reparo ósseo da deiscência apresentou-se melhor ($p < 0.05$) quando comparado com locais não cicatrizados, além de os resultados não mostrarem uma completa osseointegração.

Gurgel *et al.* (2007), em um estudo experimental em cachorros, realizaram a extração dentária dos pré-molares inferiores (p2, p3, p4) e do primeiro molar inferior. Após a cicatrização óssea de 3 meses foram confeccionados, com broca cônica em alta rotação, 2 defeitos ósseos de deiscência com as dimensões de 4 mm de largura $\times$ 5 mm de altura na face

vestibular. Em seguida os implantes de 4 mm × 8,5 mm foram instalados e estes foram divididos de forma randomizada, sendo que cada defeito recebeu 1 dos 4 tratamentos. Foi colocado diretamente no defeito ósseo PRP (Plasma Rico em Plaquetas) como grupo 1, membrana de e-PTFE como grupo 2, membrana (e-PTFE) + PRP como grupo 3 e no grupo controle, grupo 4, não foi utilizado nenhum material, nem PRP e nem membrana. Após o período de 3 meses as amostras foram verificadas histologicamente e foi observado que os grupos em que foi utilizado o PRP e no grupo controle não houveram respostas satisfatórias no reparo ósseo, no entanto no grupo em que foi utilizada a membrana houve a neoformação óssea. Histomorfometricamente foi verificado que o contato osso-implante foi maior no grupo em que foi utilizada a membrana, tendo como resultado de $40,86 \pm 22,73$, enquanto no grupo em que foi utilizada a membrana e PRP foi de $39,7 \pm 23,52$, seguido de $17,63 \pm 17,73$ no grupo de PRP, seguido de $16,52 \pm 15,96$ no grupo controle. Foi concluído que o uso de PRP não apresentou resultados adicionais na regeneração óssea em deiscência ao redor de implantes dentários.

Akagawa *et al.* (2009), em um estudo experimental em cachorros, afirmaram que a quantidade insuficiente de osso nas paredes vestibular ou lingual (fenestração) pode comprometer a função em implantes dentários e quando perdida a parede vestibular pode inclusive comprometer a estética. O objetivo foi de estudar a regeneração óssea em fenestrações ao redor de implantes dentários com a utilização de bFGF (fator de crescimento fibroblástico) e alguns complexos de gelatina hidrogel. Após a extração dos pré-molares (p1, p2, p3 e p4) foi esperado o período de 3 meses de cicatrização óssea para o preparo do sítio receptor dos implantes e instalação dos mesmos. Para tal estudo foi confeccionado defeitos ósseos mimetizando defeitos de fenestração com 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade na parede vestibular, para expor as 4 roscas dos implantes. Posteriormente foram preenchidas

as roscas expostas dos implantes com Complexo I (rápida degradação), Complexo II e Complexo III (lenta degradação) sem a utilização de membrana. Após o período de 4 semanas os cães foram submetidos a eutanásia e os blocos ósseos foram corados com azul de toluidina. Os espécimes foram analisados histologicamente em microscópio de luz e analisados histomorfometricamente pela distância entre o ponto mais baixo do defeito que foi preparado e o ponto mais alto do osso regenerado. Os resultados histológicos encontrados foram que houve contato direto entre osso-implante e não houve a presença de tecido fibroso nessa interface. O grupo do complexo III houve a presença óssea nas roscas que foram expostas, seguida do complexo II que tiveram a maioria das roscas com o preenchimento ósseo, seguido do grupo do complexo I que tiveram o preenchimento ósseo em poucas roscas. Na verificação histomorfométrica os resultados encontrados foram de $2,36 \pm 0,11$ (complexo III) seguido de $2,03 \pm 0,40$ (complexo II) e $1,55 \pm 0,36$ (complexo I). Foi concluído que o uso de bFGF com tipo de degradação lenta e complexo de gelatina podem acelerar a regeneração óssea ao redor de implantes fenestrados.

Casati *et al.* (2002), realizaram um estudo em cachorros e realizaram a extração dos pré-molares inferiores (p2, p3 e p4) e do primeiro molar inferior. Em seguida foi esperado um período de 3 meses de cicatrização e foram confeccionados por meio de osteotomias os defeitos de iscência da tábua óssea vestibular ($3,5 \text{ mm} \times 5,0 \text{ mm}$) e posteriormente foi inserido o implante ($3,75 \times 8,5 \text{ mm}$). Os defeitos foram tratados de maneira randomizada, utilizando matriz de esmalte contendo amelogénina (EMD); membrana bioabsorvível à partir de um copolímero sintético do ácido glicólico e do ácido láctico, EMD + membrana e grupo controle (sem EMD e sem membrana) com o objetivo de verificar a resposta óssea. Após 2 meses, mais 4 defeitos ósseos foram criados e tratados. Após 3 meses, as amostras foram removidas, fixadas e descalcificadas e cortadas no sentido vestibulo lingual e coradas com azul de

toluidina. E seguida as amostras foram submetidas a avaliação histométrica por um microscópio associado a uma câmera de vídeo e um software para verificar a porcentagem de osso neoformado no contato osso-implante. Os resultados encontrados foram sem diferenças significativas entre os grupos, após 1 mês não apresentou diferenças estatisticamente significantes no contato osso-implante e na área de osso novo. Após o período de 3 meses não foi encontrados resultados estatisticamente significantes entre os grupos no que se refere ao contato osso-implante, apenas o grupo em que foi utilizada a associação EMD + membrana teve um resultado superior, estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle. As áreas de neoformação óssea foram de $55,5 \pm 11,8$ (EMD); $53,8 \pm 16,3$ (membrana); $62,1 \pm 18,4$ (EMD + membrana) e $36,9 \pm 25,1$ (controle). Nas observações clínicas, todos os grupos responderam de maneira satisfatória, sem a formação de abscesso, sem supuração e sem exposição da membrana. Os autores concluíram com esse estudo que a associação de EMD + membrana pode favorecer a cicatrização óssea quando comparado ao grupo em que não foi utilizado nem EMD e nem membrana.

A metodologia do estudo experimental em cachorros de Botticelli *et al.* (2004), foi a extração do pré-molar e do primeiro molar inferior direito inferior, seguida de um período de 3 meses de cicatrização. O local da extração foi dividido em 5 grupos: 2 locais como grupo controle e 3 como grupo teste. Os 5 grupos foram utilizados implantes de $3,3 \times 10$ mm. No grupo controle (C1) foi apenas instalado o implante e no outro grupo controle (C2) foi utilizado na perfuração, uma broca a mais que a indicada pelo fabricante (5,3 mm) para a instalação do implante. Consequentemente ocorreu um defeito ósseo circunferencial ao implante de 1-1,25 mm de largura e 5 mm de altura. No grupo teste T1 a perfuração foi alargada para 7,3 mm ocasionando uma diferença circunferencial ao implante de 2-2,5 mm e 5 mm de altura. No grupo teste T2 houve a ampliação para 5,3 mm ocasionando um defeito

circunferencial de 1-1,25 mm de largura e 5 mm de altura e no grupo T3 resultou num defeito circunferencial de 2-2,5 mm e 5 mm de altura, pois foi alargado para 7,3 mm. Posteriormente houve a remoção da parede óssea vestibular com brocas e cinzéis dos grupos T2 e T3 seguido da instalação do implante. O defeito ósseo circunferencial foi em média de 2,9 mm (T2) e 3,4 mm (T3). Foi utilizado nos grupos uma membrana absorvível, com exceção do grupo controle. Foi esperado o período de 4 meses e os blocos foram removidos e colocados em solução para fixação e cortados com broca diamantada no plano vestibulo lingual. Foi realizada a redução do bloco em 20 µm, coloração com azul de toluidina e foram visualizadas em microscópio. Foram avaliadas as regiões vestibular, lingual, distal e mesial, verificando a distância entre a margem do implante, o nível coronal entre o contato osso-implante e a base do defeito ósseo. Os resultados encontrados da análise histológica foram que em defeitos ósseos de 4 paredes de 1 mm a 2,25 mm houve o preenchimento ósseo sem a utilização de material de enxertia, nos grupos em que foram removidas as paredes vestibular, houve reparo ósseo na face distal, mesial e lingual, na parede vestibular não houve reparo por completo mas houve nas bordas laterais e apicais do defeito.

2.2. Tecido adiposo e células tronco mesenquimais (CTMs)

Uma alternativa promissora para o reparo e a regeneração óssea é a utilização do tecido adiposo. O tecido adiposo apresenta, além dos adipócitos, as células-tronco mesenquimais (CTMs) (Condé-Green *et al.*, 2009).

Em meados dos anos 80, Caplan, começou a estudar as células adultas progenitoras multipotentes. Estas células foram nomeadas, células-tronco mesenquimais (CTMs) devido ao seu potencial em diferenciar-se em multilinhagens distintas (Caplan, 2009).

As CTMs têm a capacidade de se modificarem e de fornecer a substituição de células diferenciadas, ou seja, a capacidade da célula de ser induzida a partir de uma linhagem específica, fenômeno que é também conhecido como plasticidade (Caplan, 2009).

Justesen *et al.* (2004), avaliaram o potencial de transdiferenciação de adipócitos extramedulares maduros (subcutâneos) em osteoblastos *in vitro* e *in vivo*. Os adipócitos foram obtidos de pacientes de cirurgia plástica por meio de procedimentos de lipoaspiração. O material lipoaspirado foi submetido a digestão enzimática e centrifugação. Os adipócitos foram obtidos da camada superior do material centrifugado e expandidos em meio de cultura. Após, os adipócitos foram desdiferenciados em culturas controle por períodos de 1 a 2 semanas. Posteriormente, as células foram incubadas por um período de 4 semanas tanto em meio de cultura osteogênico como adipogênico. Estas células foram também misturadas com um pó de tricálcio-fosfato hidroxiapatita e implantadas no tecido subcutâneo de ratos imunodeficientes por um período de 8 semanas. Os resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que adipócitos extracelulares podem se transdiferenciar em osteoblastos.

Além do tecido adiposo ser uma fonte de obtenção de células-tronco, estas podem ser obtidas mais comumente da medula óssea, sendo também obtida da pele, intestino, polpa dentária, tecido nervoso, córnea, cartilagem e tecido muscular (Caplan, 2009). Somando-se a isto todo vaso sanguíneo contém células mesenquimais no endotélio do vaso (algumas destas CTMs) (Caplan, 2009; Torres *et al.*, 2007).

Uma fonte de obtenção do tecido adiposo pode ser a partir da lipoaspiração. O tecido adiposo autólogo que apresenta as CTMs, podem ser cultivadas e posteriormente serem utilizadas para a estimulação óssea (Di Bella *et al.*, 2008, Kimelman *et al.*, 2007).

No que se refere a quantidade de CTMs que o tecido adiposo humano pode apresentar, Zuk *et al.* (2001), em seu estudo em que foi realizada a obtenção do tecido adiposo humano

por meio de lipoaspiração. Foi lipoaspirado em torno de 300 centímetros cúbicos e após o processamento desse tecido as amostras apresentaram uma quantidade de $2-6 \times 10^8$ células. O processamento consistiu na lavagem do tecido adiposo em solução tampão de fosfato e em seguida foi submetido à digestão de collagenase e centrifugado para a obtenção do “pellet”. Foi realizada a descontaminação da presença de células vermelhas do sangue e conseqüente foi realizada a centrifugação e a filtragem para a remoção dos restos celulares. As células foram cultivadas em CO₂ atmosférico, neutralizadas em meio de cultura (DMEM) e conseqüente lavadas em solução tampão de fosfato para a remoção das células vermelhas do sangue, foi assim obtido o “lipoaspirado processado” (PLA). As células de PLA foram mantidas a 37°C em meio de controle não indutivo.

As técnicas de processamento do tecido adiposo autógeno podem ser realizadas a partir da: centrifugação, sedimentação ou decantação e lavagem. Condé-Green *et al.* (2009), em seu estudo em que foi realizada a lipoaspiração do abdômen de 20 pacientes e foram retiradas por meio de uma cânula 120 ml de tecido adiposo. O intuito foi de verificar a melhor técnica de processamento e foi mostrado que a morfologia e a quantidade de adipócitos diferiram nas três técnicas utilizadas. Foi realizada a decantação de 30 ml de tecido aspirado em uma seringa sob ação da gravidade. A lavagem foi realizada em 50 ml de tecido lipoaspirado e foi realizada 3 lavagens em soro fisiológico na proporção de 1:1. O processo de centrifugação foi realizado a partir de 40 ml de tecido aspirado e estes foram divididos em 4 seringas que foram centrifugadas por 3 minutos sob 300 rotações por minuto. Os resultados encontrados foram estatisticamente significante nas três amostras, quando feita a decantação, os adipócitos mantiveram-se relativamente intactos, com a preservação de sua morfologia inicial, mostrando um elevado número de células nucleadas. Na lavagem, houve uma redução do número de adipócitos intactos, e na centrifugação grande parte dos adipócitos

apresentaram-se destruídos com um número limitado de adipócitos intactos. Conclui-se que a técnica de lavagem foi considerada a melhor por manter a integridade e o número dos adipócitos, além de remover as células sanguíneas contaminantes, manter as células endoteliais e as CTMs. A centrifugação foi a mais agressiva aos adipócitos e a decantação apresentou uma maior quantidade de células sanguíneas contaminantes e menos CTMs.

No estudo de Rose Jr *et al.* (2006), em que foi realizada a lipoaspiração de 22 pacientes, o processo de decantação pareceu produzir uma maior proporção de adipócitos viáveis do que quando realizada a lavagem ou a centrifugação. E quando realizada a lavagem e a centrifugação, estes processamentos pareceram render proporções similares de adipócitos viáveis. Uma alternativa à lipoaspiração do abdômen é a remoção da gordura da crista ilíaca, pois esta é considerada uma fonte abundante de tecido adiposo.

A técnica de remoção da gordura dessa região é bastante simples e a cicatriz fica num local menos visível quando comparada a outras técnicas de remoção (Papadopoulos H. e Edwards S., 2009).

Sadick e Hudgins (2001), realizaram um trabalho com o objetivo de verificar a viabilidade *in vivo* do tecido adiposo autógeno, após o período de 1 ano preservação. O estudo foi em 6 pacientes que receberam transplante autógeno de gordura da região do glúteo para a região do sulco nasolabial. As regiões foram analisadas em 4, 6 e 12 meses após o procedimento por meio de fotografias. Os resultados apresentados foram de uma resposta favorável, ou seja, os autores afirmaram que a sobrevivência de adipócitos a longo prazo foi possível após a transferência da gordura.

Lendeckel *et al.*(2004) realizaram um procedimento cirúrgico em uma criança de 7 anos que sofreu uma queda resultando na fratura da calvária. Foi utilizado osso autógeno da

crista ilíaca com a associação de células-tronco derivada do tecido adiposo que foram obtidas da região do glúteo. Posteriormente 42,3 g de tecido adiposo que foi coletado, foi dissecado em pequenos pedaços e foram transferidos para uma bolsa de sangue estéril e foram processados, ou seja, foram lavados e passaram por digestão enzimática e foram lavados novamente e centrifugados e as células coletadas foram levadas para 14 ml de soro. Como resultado foi verificado um total de 295×10^6 células mononucleadas. Podendo de 2 a 3 % dessas células serem as células-tronco. Posteriormente 10 ml de células-tronco derivadas da gordura foram injetadas nos espaços das placas de fixação e juntamente foi utilizado cola de fibrina autógena para manter as células no local. O resultado clínico foi de cicatrização com contornos simétricos e após 2 e 6 semanas foi verificado a presença de osso esponjoso. Foi realizada 3 meses do procedimento cirúrgico, tomografia computadorizada e foi verificada a presença de ossificação nas áreas do defeito.

Lendeckel *et al.* (2004), realizaram em 3 pacientes testes funcionais e verificaram a viabilidade das células-tronco derivadas do tecido adiposo após passar pelo processamento. Foi constatado que a capacidade funcional das células eram altamente puras quando comparadas com as células removidas da medula óssea de pacientes jovens e saudáveis. Confirmando dessa maneira a importância das células de origem de tecido adiposo.

As CTMs são uma opção viável para a formação óssea, de acordo com a revisão realizada por Kimelman *et al.*, 2007. A engenharia dos tecidos pode ser utilizada para que exista a formação óssea a partir da realização *in vitro* ou *in vivo* por meio da combinação de material osteocondutivo, células osteopotentes e fatores de crescimento (Weinzierl *et al.* 2006).

O estudo de Zuk *et al.* (2001), confirma a capacidade de as células do tecido adiposo por lipoaspiração se diferenciarem em linhagens adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e miogênicas após utilizados fatores de indução de linhagens específicas.

Weinzierl *et al.* (2006), realizaram o método de cultivo *in vitro* por meio de tecido adiposo de pacientes, removidos da coxa, para avaliar o potencial de diferenciação das CTMs após o processamento do tecido adiposo. O objetivo foi avaliar o potencial de diferenciação osteogênica no que se refere a idade do doador e a criação de agregados tridimensionais, cultivados *in vitro*. O tecido adiposo foi picado, submetido a digestão de collagenase e centrifugado. As células foram cultivadas em CO₂ atmosférico e neutralizada em meio de cultura (DMEM) e soro, após a colonização das células foi realizada a tripinização e distribuídos em 4 frascos. As células-tronco derivadas do tecido adiposo passou pelas 4 diferenciações: adipogênica (se diferenciar em adipócitos), osteogênicas (células ósseas), miogênicas (células musculares), e diferenciação padrão utilizada como grupo controle. O meio de diferenciação foi trocado 2 vezes por semana e após 6 meses as culturas foram fixadas para análise histológica. Pôde-se constatar que as células-tronco derivada de tecido adiposo têm a capacidade de se diferenciarem em adipócitos, células musculares lisas e osteoblastos, ainda que o potencial de diferenciação osteogênica não se mostrou dependente da idade e a diferenciação osteogênica tridimensional em fibras colágenas é possível.

Qu *et al.* (2007), realizaram uma pesquisa experimental em porcos para observar se o modelo é válido para estudo de linhagens mesenquimais, no que se refere a utilização de CTMs de origem de tecido adiposo. O objetivo foi de verificar se o tecido de gordura de suínos após passar por processamento *in vitro* poderia ser isolado e após indução se diferenciariam em adipócitos e osteoblastos. Os autores afirmam que o tecido adiposo, do modelo animal adotado, apresentou potencial adipogênico e osteogênico.

Zheng *et al.* (2006) realizaram um estudo para verificar se a utilização de tecido adiposo visceral de ratos contém CTMs capazes de se diferenciarem em multilinhagens *in vitro* e *in vivo*. O tecido adiposo visceral foi excisionado e submetido a digestão enzimática em colagenase tipo XI e a atividade enzimática foi neutralizada em meio de cultura contendo DMEM e 10 % de soro fetal bovino. Estas foram então centrifugadas e os adipócitos foram separados do “pellet”. O material foi passado em cloreto de amônio, incubado sob temperatura ambiente por 10 minutos para descontaminação da presença de células vermelhas do sangue e foi novamente centrifugado. Posteriormente o mesmo foi peneirado para remover os remanescentes celulares. O número e a viabilidade das células foram identificados utilizando uma exclusão de azul de tripano, foi passado pelo DMEM e cultivadas em CO₂ atmosférico. Após 24 horas foi realizada a lavagem com solução tampão de fosfato para remover as células não aderentes. Após foi realizada *in vitro* a diferenciação adipogênica, condrogênica, osteogênica, hematopoiética e *in vivo* condrogênica e osteogênica; miogênica, hematopoiética. Os resultados encontrados demonstraram que a utilização das CTMs derivadas de tecido adiposo visceral apresentaram alta capacidade de reparo em osso e cartilagem.

Tobita *et al.*(2008) realizaram um estudo experimental em ratos com o objetivo de verificar se as CTMs derivadas do tecido adiposo podem promover a regeneração do tecido periodontal. O tecido adiposo foi removido dos animais e foi processado com a finalidade de obter as células-tronco. O processamento foi realizado quase similar ao descrito no artigo acima. Houve o preparo do PRP e posteriormente foi realizada antes da implantação, uma mistura de 1×10^7 de CTMs de tecido adiposo com 1 ml de PRP foram ativados com uma solução de cloreto de cálcio que induz a geleificação. Foram removidos os tecidos periodontais, incluindo cimento, osso alveolar e ligamento periodontal na região palatina do

primeiro molar sob irrigação com soro fisiológico com broca esférica caracterizando um defeito de $1 \times 1 \times 1$ mm. Após foi injetado no defeito a mistura de CTMs de tecido adiposo com o PRP. Serviu como grupo controle os ratos em que foi utilizado somente PRP. As amostras de tecido foram removidas após 2, 4 e 8 semanas para a análise histológica. Após 2 e 4 semanas o grupo que recebeu a associação de CTMs derivadas do tecido adiposo e PRP tiveram uma pequena regeneração de osso alveolar, em 4 semanas houve formação óssea cercada por tecido conjuntivo, no grupo em que foi utilizado apenas PRP não houve a formação de tecido periodontal e nem regeneração óssea. Após o período de 8 semanas foi observada além do osso alveolar, presença de cemento e ligamento periodontal, no grupo em que foi utilizado PRP não houve a presença de ligamento periodontal. Pôde-se concluir que a associação de CTMs de tecido adiposo com PRP tiveram uma resposta favorável, ou seja, tiveram a formação das estruturas que se esperavam para a regeneração do tecido periodontal (cemento, ligamento periodontal e osso alveolar), validando dessa maneira a utilização de CTMs de tecido adiposo após o processamento.

Taub *et al.* (2009) em estudo experimental em calvária de ratos adultos puderam concluir que as células-tronco adultas multipotentes responderam com diferenciação dos osteoblastos sem utilizar a engenharia genética de fatores ósseo indutivos. As células-tronco adultas multipotentes tiveram a origem de músculo esquelético, mais precisamente do glúteo e foram cultivadas em uma matriz de malha de ácido poliglicólico. Foram confeccionados com brocas os defeitos críticos de 8 mm na calvária dos animais em seguida os defeitos foram preenchidos com uma malha de ácido poliglicólico, ou preenchidos com CTMs semeadas dentro da malha de ácido poliglicólico ou como grupo controle. Após 12 semanas, observaram por meio de microscopia de luz, a presença ou a ausência de reconstituição óssea. No exame macroscópico foi verificado uma camada de osso neoformado nos espécimes em

que foram utilizadas as CTMs juntamente com a malha de ácido poliglicólico. Na microscopia o grupo em que foi utilizado somente o ácido poliglicólico teve como resultado uma pequena regeneração óssea. O resultado foi de 1,9 no grupo controle seguido de 2,3 no grupo do ácido poliglicólico seguido de 5,3 no grupo preenchidos com CTMs semeadas dentro da malha de ácido poliglicólico.

Di Bella *et al.* (2008), avaliaram em um experimento em coelhos, a capacidade das CTMs derivadas de tecido adiposo autógeno com associação com o ácido polilático (PLA) em regenerar defeitos críticos em crânio. O tecido adiposo foi removido da superfície inguinal direita e foi realizada a técnica de rotina para isolamento das CTMs. Os defeitos de 15 mm de diâmetro foram confeccionados no crânio com brocas finas. Foi realizado o tratamento dos defeitos, sendo dividido em 5 grupos: PLA (grupo controle), fibronectina revestida com PLA (grupo 2), PLA + CTMs de tecido adiposo (grupo 3), fibronectina revestida com PLA + CTMs de tecido adiposo (grupo 4), PLA + CTMs de tecido adiposo com indução osteogênica (grupo 5) e fibronectina revestida com PLA + CTMs de tecido adiposo (grupo 6). O material foi posicionado no defeito e em seguida foi realizada a sutura. Após 6 semanas os animais foram eutanasiados para análise histológica, histomorfométrica e radiográfica. Os resultados histomorfométricos e histológicos encontrados foram que o grupo 3, 4 e 5 houve maior formação óssea quando comparados aos grupos 1 e 2; os grupos 5 e 6 resultaram em maior formação óssea quando comparados com os grupos 3 e 4. Os grupos com PLA tratados com CTMs (grupos 3 e 5) resultaram em 1,76% de osso, os grupos tratados com PLA revestidos com fibronectina e CTMs (grupos 4) a quantidade óssea foi de 7,45%, o grupo 6 foi de 12,09% e de 2,45% no grupo 4 e 0,68% no grupo 2. Na análise radiográfica foi visualizada a área de radiodensidade e foi observada que a fibronectina tem uma influência positiva na formação óssea. Os autores concluíram que a utilização de CTMs derivadas da gordura são facilmente

obtidas e expandidas *in vitro* e podem ser estimuladas para a diferenciação óssea. A utilização do PLA como arcabouço é positiva, já a utilização de poros maiores de fibronectina pode tornar a estrutura frágil, sendo necessários maiores estudos.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi de avaliar o reparo ósseo, por meio de histomorfometria, em defeitos de deiscência criados cirurgicamente ao redor de implantes dentários, instalados em tíbias de coelhos e tratados com enxerto de tecido adiposo (grupo TA), osso autógeno (OA) associados à membrana de colágeno bovino.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Positivo, Curitiba-PR, Brasil sob protocolo número 130/2008.

Foram utilizados 18 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*) que foram submetidos ao procedimento cirúrgicos sendo que estes foram divididos em três grupos: tecido adiposo (TA), osso autógeno (OA) e grupo controle (C). Os animais tinham idade aproximada de 6 meses e com peso variando de 2,5 a 3,5 kg. Os coelhos apresentavam boas condições de saúde. Os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente com a duração de 15 dias.

Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério da Universidade Positivo, Curitiba-PR, Brasil, recebendo água mineral e ração comercial (Nuvital) *ad libitum*. Durante todo o período experimental, as condições ambientais de luz, temperatura e umidade das salas foram controladas em painel digital de maneira a manter o fotoperíodo de 12 horas, com a temperatura variando de 18 a 22°C e umidade de 65%.

Todos os cuidados com a esterilização dos materiais utilizados nessa pesquisa foram seguidos. Os materiais utilizados para a realização das cirurgias foram esterilizados em autoclave. Com uma tesoura foi realizada a tricotomia nas regiões que foram submetidas ao acesso cirúrgico. Essas regiões e todos os equipamentos receberam anti-sepsia com Iodopovidona (PVPI) a 10%. Esse procedimento foi realizado com luva cirúrgicas e em mesa auxiliar, em local diferente daquele onde foram realizadas as cirurgias. Na mesa cirúrgica foi utilizado um lençol térmico para manter uma temperatura apropriada, sabendo-se que o modelo animal adotado poderia apresentar uma elevada hiperemia. O cirurgião e o auxiliar

fizeram o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) (máscara, gorro e luvas cirúrgicas) nas cirurgias e na manipulação dos materiais de enxerto.

4.1. Protocolo anestésico

Como medicação sedativa foi aplicado 1 mg/Kg de Midazolam (União Química, Brasil) por via intramuscular. Após a sedação, os animais receberam uma medicação anestésica, contendo uma associação de 35 mg/Kg de Cloridrato de Quetamina a 10% (Syntec, Brasil) com 5 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina a 2% (Vetrans, Brasil) por via intramuscular. Após a indução do plano anestésico, estabeleceu-se o acesso venoso pela veia marginal da orelha para manutenção anestésica durante o procedimento cirúrgico (figura 1). Em seguida, o coelho foi posicionado na mesa cirúrgica em decúbito lateral. A anestesia foi mantida pela vaporização de Isoflurano (Cristália, Brasil) por máscara facial (figura 2).

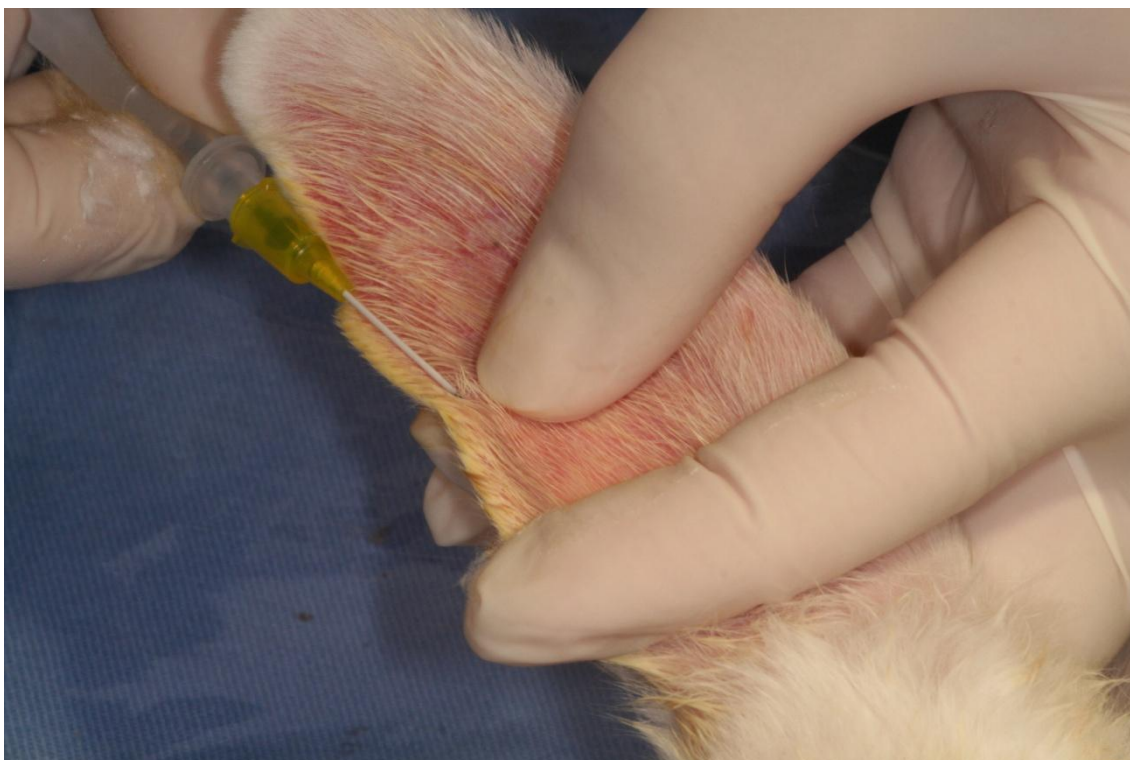


Figura 1 – Acesso venoso pela veia marginal da orelha.



Figura 2 – Máscara para a inalação do Isoflurano.

Durante o período trans-operatório foram controladas a frequência cardíaca e a saturação de oxigênio por um oxímetro de pulso modelo OX-P-10 EMAI (Brasil). Todos os animais tiveram a supervisão dos batimentos cardíacos com aparelho de eletrocardiograma modelo Miniscope II (Brasil).

Para a realização das cirurgias, foi realizada a escolha randomizada dos grupos, utilizando a tíbia direita e a esquerda, sendo que cada tíbia recebeu apenas um grupo (Anexo 2). Houve a criação do defeito ósseo, instalação de um implante e, na seqüência, o tratamento indicado.

4.2. Procedimentos cirúrgicos

Incisões com lâmina de bisturi nº 15 foram realizadas para acesso cirúrgico nas regiões internas da tíbia direita e esquerda dos animais, mais precisamente na metáfise óssea.

Após o rebatimento dos tecidos foram realizadas as perfurações com 1.200 rotações por minuto (rpm) de rotação em redução de 1:20. Foi seguida a seqüência de brocas, conforme indicações do fabricante do sistema de implante: broca lança, seguida da broca 2 mm, broca 2-3 e finalmente broca 2-8, sempre com irrigação abundante de soro fisiológico (figura 3).

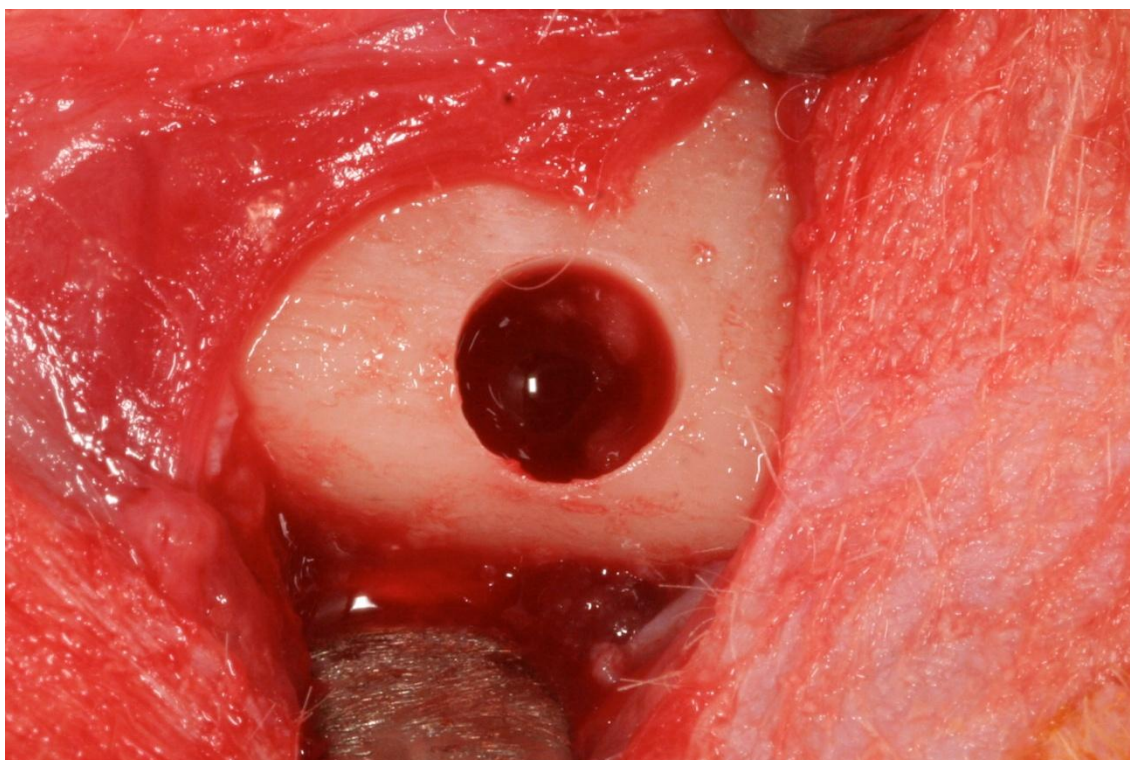


Figura 3 – Perfuração final após a utilização da seqüência de brocas indicada pelo fabricante.

Anteriormente à inserção dos implantes foram confeccionados os defeitos ósseos, na parede óssea medial, com broca esférica carbide de alta rotação (rotação de 22000 rpm), adaptado em baixa rotação e irrigação abundante com soro fisiológico. Os defeitos produzidos tinham 3 mm de largura e 5 mm de altura, medidos com sonda milimetrada tipo Carolina do Norte (Hu-Friedy Co, Chicago) para caracterizar defeito deiscência. Os implantes utilizados no estudo foram de titânio comercialmente puro (grau 4), com tratamento de superfície (Systhex, Brasil) e tamanho de 3,3 mm × 8,5 mm.

Em seguida os implantes foram inseridos manualmente em posição, até a plataforma do implante dentário ficar em nível ósseo e todos eles receberam um parafuso de cobertura (figura 4).

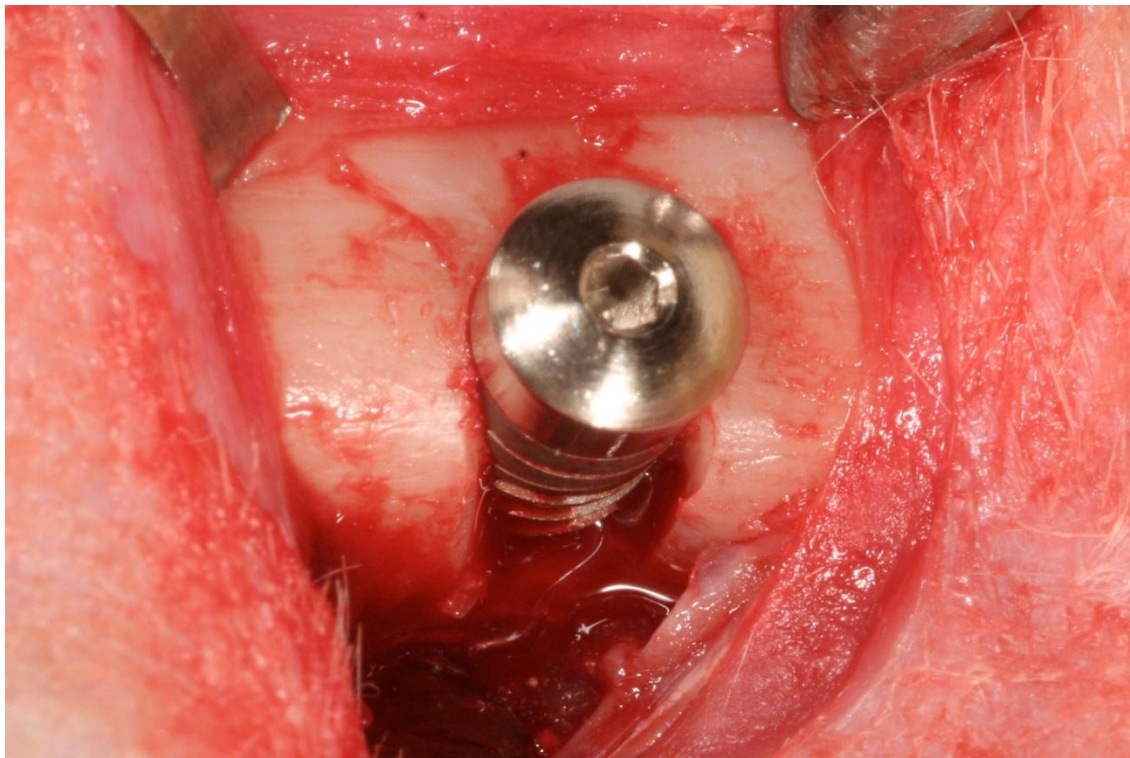


Figura 4 – Colocação do implante no defeito criado cirurgicamente.

Para a obtenção do tecido adiposo, foi 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 aproximado de 1 cm. O tecido adiposo da região exposta foi removido cuidadosamente com uma tesoura cirúrgica (Goldman/Fox) e pinças cirúrgicas (figura 5). O tecido foi posteriormente seccionado no tamanho aproximado de 10 mm para a enxertia. Foi iniciada a sutura colchoeiro com Vicryl® 5 (Ethicon, Brasil), em seguida foi posicionada a membrana de colágeno bovino (Genius-Baumer, Brasil). A membrana foi posicionada recobrando todo o defeito (figura 6). Em seguida o enxerto foi imediatamente levado ao defeito cirúrgico e os tecidos moles foram reposicionados por meio do fechamento da sutura

iniciada anteriormente. Foram realizadas as suturas nos tecidos mais profundos com pontos simples até recobrir totalmente o implante e fechamento do retalho cirúrgico. Em seguida, foi realizada uma sutura colchoeiro contínua nos tecidos mais superficiais, para garantir a coaptação completa dos tecidos. Foram realizados os curativos com gaze e esparadrapo nas regiões em que foram realizadas as cirurgias.

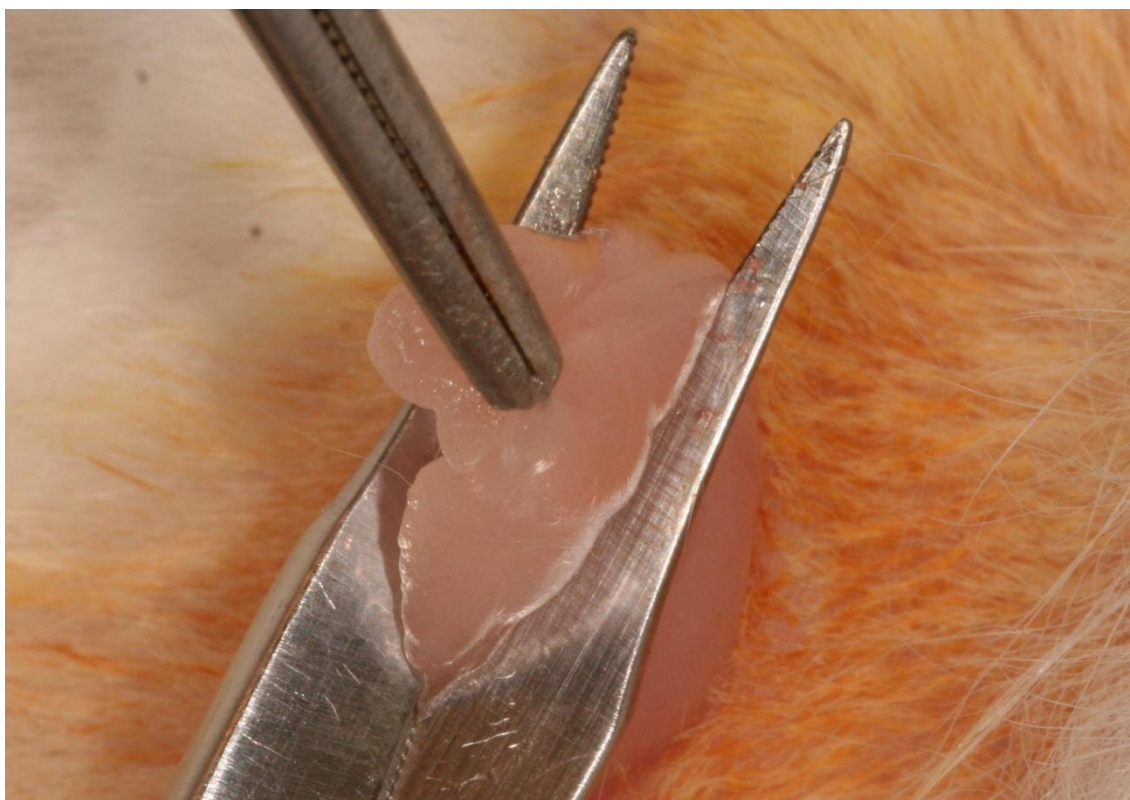


Figura 5 – Remoção do tecido adiposo com a utilização de pinça e de tesoura.

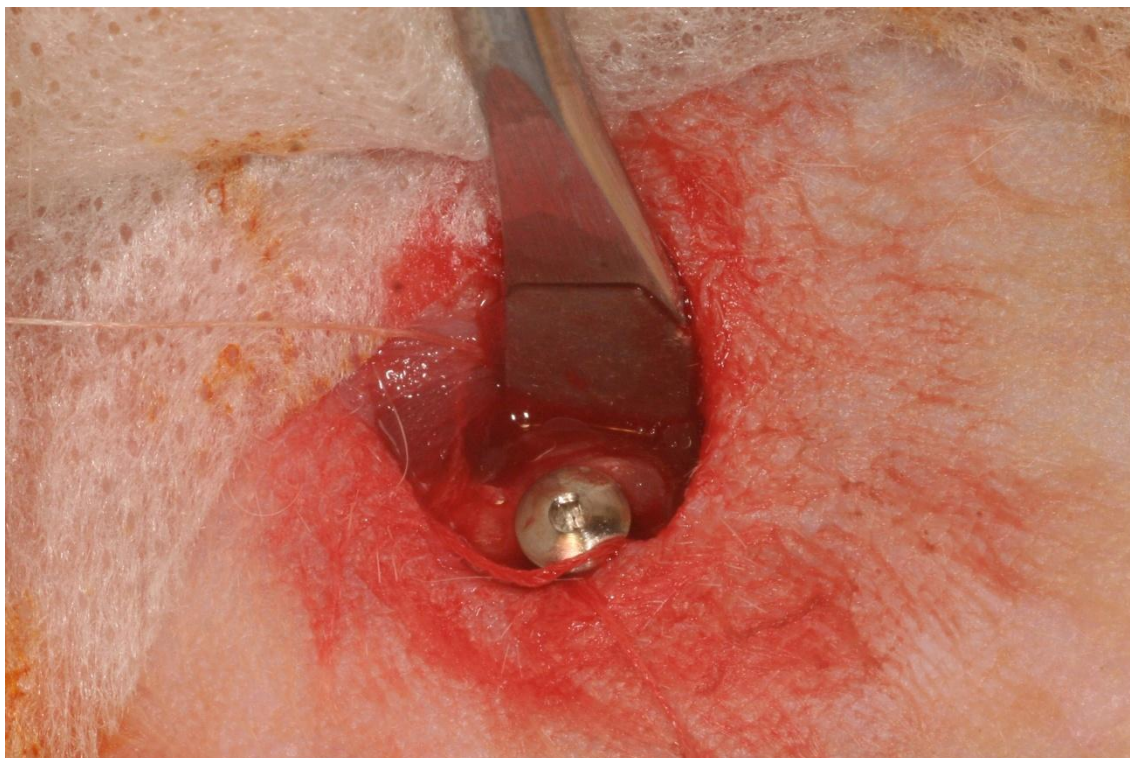


Figura 6- Posicionamento da membrana e do tecido adiposo recobrindo o defeito ósseo.

Para o grupo em que foi utilizado o tratamento do defeito ósseo com o osso autógeno foi realizada a seqüência similar à descrita anteriormente, ou seja, a seqüência do início da cirurgia até a confecção do defeito ósseo. A coleta óssea foi com o auxílio de broca trefina (SIN – Sistema de Implantes, Brasil) de 5 mm de diâmetro e sob rotação de 22000 rpm (figura 7). O local da coleta foi de aproximadamente 0,5 cm do local do preparo do defeito ósseo e instalação do implante. Posteriormente o osso foi triturado manualmente, com o auxílio de um triturador (Kopp, Brasil), sem esforço físico. Apenas foi solta 5 vezes a parte de cima do moedor sobre a base do moedor. Posteriormente foi realizada a sutura, conforme descrito anteriormente e foi posicionada a membrana de colágeno bovino. O enxerto autógeno foi levado ao defeito ósseo, recobrindo-o totalmente e, em seguida, foi feita a sutura, seguida da realização da sutura nos tecidos mais profundos e nos mais superficiais, bem como o curativo com gaze e esparadrapo.

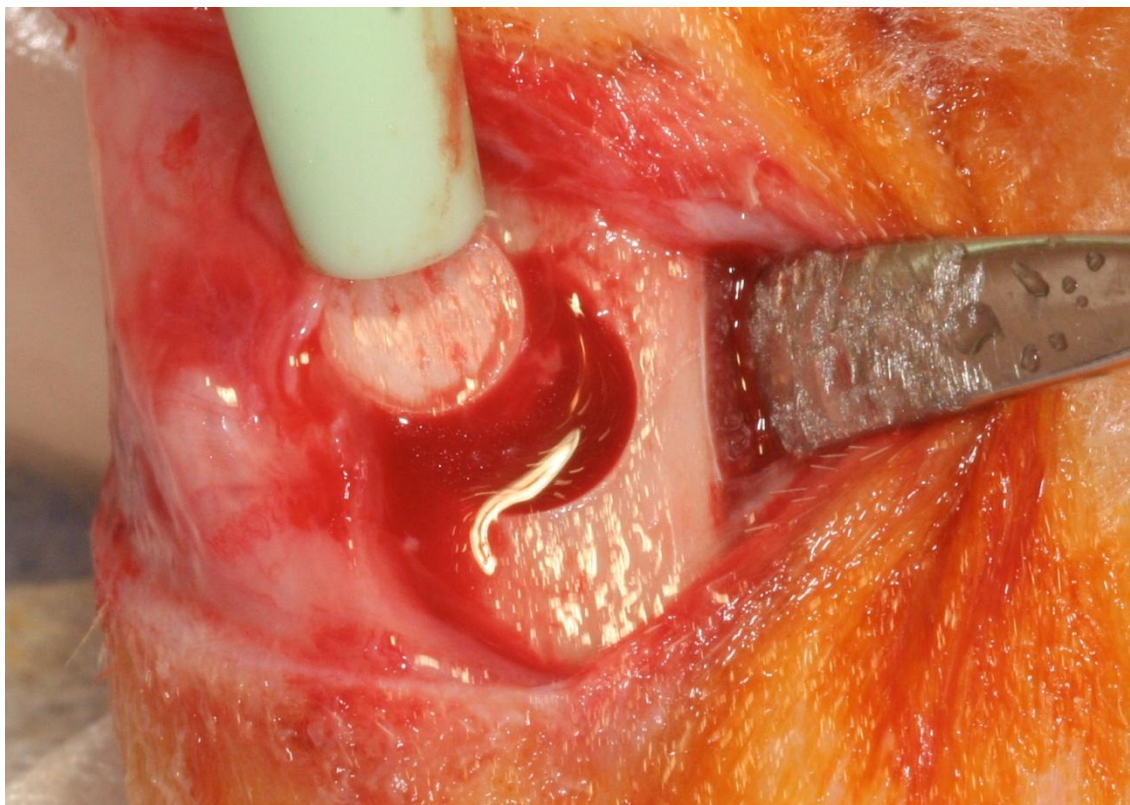


Figura 7 – Remoção óssea após a utilização da broca trefina.

No grupo C, foi realizada apenas a confecção do defeito e a colocação do implante, não sendo utilizado nem a membrana de colágeno, nem o material de enxertia.

4.3. Controle do pós-operatório e eutanásia

Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam 8 mg/Kg de Tartarato de Butorfanol (Fort Dodge Saúde Animal LTDA, Brasil) por via subcutânea a cada 8 horas durante 2 dias e dose única de 0,5 ml de Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (Pentacilin-C (Fort Dodge Saúde Animal LTDA, Brasil). Com a finalidade de assegurar o controle da dor, foi aplicado gel transdérmico de 1 mg de Tramadol (Drogavet, Brasil) nas orelhas em que foi realizado o acesso venoso 3 vezes ao dia durante os 3 primeiros dias de pós-operatório.

Os animais foram eutanasiados após 90 dias do procedimento cirúrgico respeitando as normas nacionais e internacionais de bem-estar animal, com a aplicação intramuscular de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Quetamina (1ml de cada), seguida de uma aplicação intravenosa de 10 ml de Tiopental Sódico (Cristália, Brasil).

4.4. Remoção dos blocos ósseos

Os blocos ósseos foram cortados, após a eutanásia dos animais, envolvendo os implantes e a região do defeito. A margem de segurança foi de aproximadamente 6 mm da localização do implante. A remoção foi realizada com um disco dentado diamantado (Komet, Alemanha) montado em peça de mão reta à 22000 rpm, e acondicionados em tubos de ensaio identificados, com formalina a 10% (VETEC Química Fina, Brasil) para a fixação das peças.

4.5. Processamento histológico das peças

Após a fixação dos blocos ósseos em formalina, estes foram novamente identificados (duplamente) e lavados, em água corrente, por um período de 24 horas. A posição dos implantes nos blocos ósseos foi traçada com um lápis preto macio – 2B (Faber Castell, Brasil). Então, as peças ósseas foram desidratadas em uma série alcoólica (Vetec Química Fina, Brasil) seguindo a seguinte sequência: álcool 70° (12 horas), 80° (2 horas), 90° (2 horas), 100° (2 horas) e 100° (2 horas). Os blocos foram mergulhados em acetona P.A. (Vetec Química Fina, Brasil) por um período de 12 horas, e em uma mistura de acetona e metacrilato de metila (proporção de 1:1) por mais 12 horas. As peças ósseas foram ainda mergulhadas em metacrilato de metila por 12 horas e então acriladas como segue. Cada bloco ósseo foi colocado em um tubo de ensaio, duplamente identificado, onde foi colocado metacrilato de metila (Artigos Odontológicos Clássico, Brasil) associado a 2% de peróxido de benzoíla (Vetec Química Fina, Brasil) ou 2g de peróxido de benzoíla para 100 ml de metacrilato de

metila. Então, os tubos de ensaio, contendo as peças ósseas, foram levados a um dissecador e mantidos em vácuo por 15 minutos (figura 8). Após este período, os tubos de ensaio contendo as peças foram retirados do dissecador, vedados com papel alumínio duplo, fita crepe (3M para autoclave) e elásticos, e, então, levados a estufa (a uma temperatura de 37 °C) para a completa polimerização do acrílico (figura 9).



Figura 8 – Tubos de ensaio no dissecador.



Figura 9 – Vedamento dos tubos de ensaio.

Cada bloco foi cortado, em uma máquina cortadora (Policorte Mesotom-Panambrá/Struers, Brasil), com um disco diamantado, no sentido perpendicular ao longo eixo da tíbia. A margem de segurança para a realização desse corte foi a mais próxima do implante, mas sem incluí-lo nesse corte (figura 10). As peças seccionadas foram desgastadas no mesmo sentido como descrito anteriormente em uma politriz de mesa (DP-10 Panambrá/Struers, Brasil), utilizando uma sequência de lixas sob irrigação abundante com água de uma pingadeira elétrica (Plaster, Brasil). As granulações das lixas d'água utilizadas foram respectivamente de número 150, 250, 500. Para a realização dos desgastes foi realizado a fixação das peças em um bloco de baquelite com cera pegajosa (figura 11). As amostras

foram reduzidas até atingirem secções aproximadas de 0,6 mm de espessura, estas foram aferidas por meio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil).



Figura 10 – Peça após o corte na máquina. Figura 11 – Peça fixada no bloco de baquelite.

A seguir, as peças cortadas e polidas foram submersas e agitadas em uma solução de H_2O_2 por 5 minutos e posteriormente foram lavadas em água destilada e secas. As peças foram então coradas com Azul de Toluidina após imersão, na mesma, por um período de 20 minutos. As lâminas foram secas com papel absorvente e o vidro de armazenamento foi limpo com álcool 70°. Um período de 24 horas foi aguardado para a completa secagem do corante. Após a execução destes procedimentos os espécimes estavam prontos para visualização em microscópio óptico de luz.

4.6. Análise histomorfométrica

Os espécimes preparados para a análise histológica foram visualizados em microscópio óptico de luz (Olympus BX41 TF, Japão). As peças foram apenas colocadas em cima de uma lâmina de vidro para a visualização no microscópio. As imagens obtidas foram fotografadas por meio de uma câmera digital Cool Snap-Pro (Media Cybernetics, EUA) acoplada ao microscópio. A obtenção de imagem foi realizada por meio do programa Image

Pro Plus (Media Cybernetics, EUA). As fotomicrografias foram realizadas na objetiva em 40 × e em 100 × e a captação das imagens foram individuais para cada rosca, nas primeiras 4 roscas do implante. As fotomicrografias foram arquivadas para a posterior análise histomorfométrica.

Para a análise histomorfométrica foram avaliadas as porcentagens de contato osso-implante e a área óssea, entre as 4 roscas principais mais coronárias dos implantes, apenas no lado que foi caracterizado defeito deiscência. As aferições foram realizadas por um único avaliador, utilizando-se um software analisador de imagens - Image Tool, versão 3,0 (EUA) - (figura 12). Este modelo seguiu o protocolo proposto por Sennerby *et al.* (1992).

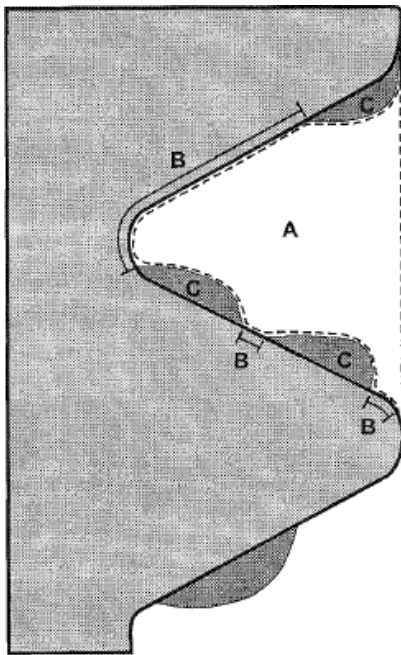


Figura 12 - Ilustração esquemática dos parâmetros histomorfométricos analisados. Em cada rosca (roscas de 1 a 4) do lado do defeito ósseo do implante a porcentagem de área óssea e o contato osso-implante foram mensurados. A área óssea dentro dos limites da rosca do implante é representada pela letra A. A extensão do contato osso-implante dentro dos limites da rosca é representada pela letra B. A letra C representa os espaços ocupados pela medula óssea (Sennerby *et al.*, 1992).

Para facilitar a interpretação do contato osso-implante foi realizado em programa Adobe Photoshop 6.0 (EUA) a reconstrução das imagens em filtro raio de 5,8 pixels.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. O teste estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) foi realizado para testar a hipótese de que o grupo TA apresenta resultados iguais ou melhores do que os grupos OA e C. Estes resultados levaram em consideração a porcentagem de contato osso-implante e a área óssea dentro dos limites das roscas dos implantes.

5. Resultados

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de dois diferentes biomateriais (tecido adiposo e osso autógeno particulado) como alternativas no tratamento de deiscências periimplantares produzidas artificialmente em tíbias de coelho. Os efeitos induzidos por esses biomateriais foram analisados em dois parâmetros distintos: (1) percentual de contato osso-implante e (2) área de neoformação óssea produzida nas áreas abrangentes de cada rosca do implante dentário.

5.1. Percentual de contato osso-implante

Para estabelecer o percentual entre o contato íntimo do osso neoformado e o implante foram realizadas mensurações lineares no perímetro do implante dentário e contabilizadas tanto as medidas totais (das quatro roscas expostas) como a medida dos perímetros tangentes ao tecido ósseo. Para obter esses resultados para a medida linear, fotomicrografias capturadas em magnificação de 100× foram analisadas histologicamente. Na figura 13 encontram-se os principais aspectos histológicos bem como a reconstrução das imagens em filtro raio de 5,8 pixels no programa Adobe Photoshop 6.0 evidenciadas entre os grupos.

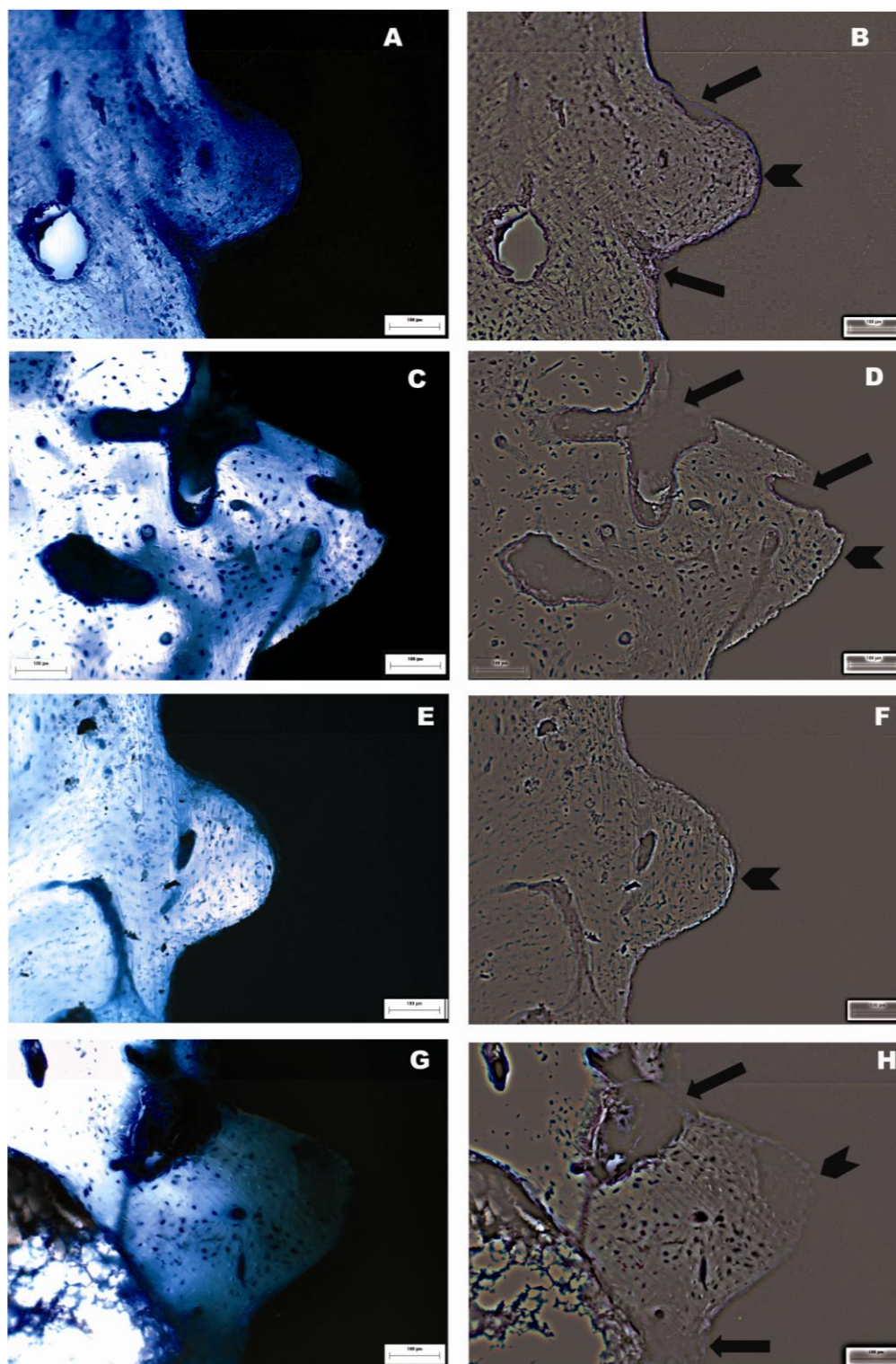


Figura 13 – A, B, C e D revelam cortes histológicos em defeitos tratados com TA. Em E e F verificam-se fotomicrografias de deiscências em que foram enxertadas OA, enquanto que G e H referem-se ao grupo controle (C). As cabeças de setas evidenciam áreas de íntimo contato entre osso neoformado e a superfície do implante. As setas demonstram áreas em que não ocorreu interação osso-implante.

Quando analisadas as médias percentuais de tecido ósseo tangente à rosca do implante dentário, os resultados deste trabalho identificaram similaridades, sem diferenças estatísticas significantes, entre os grupos TA e C, entretanto, um maior e significativo percentual, com diferenças estatisticamente significantes, quando comparados os grupos TA e C, foi identificado no grupo em que as deiscências ósseas foram tratadas com a utilização de osso autógeno (grupo OA). As médias percentuais para cada grupo pode ser verificada na tabela 1.

Tabela 1 – Porcentagem de área de contato osso-implante.

Percentual de contato	Grupos			<i>p</i> *
	Tecido Adiposo	Osso autógeno	Controle	
	37,75 ± 28,03 ^b	83,37 ± 11,85 ^a	40,57 ± 13,71 ^b	<i>p</i> ≤0,05

* Valores com o mesmo sobrescrito são estatisticamente similares (ANOVA).

Embora as médias (tabela 1) e medianas (figura 14), tanto para o grupo TA e C serem estatisticamente similares, um quesito relevante deste trabalho foi a evidência em que o grupo TA demonstrou intensa heterogeneidade nos valores das amostras. Esta discrepância é evidenciada por representação gráfica (Figura 14) por mostrar maior amplitude entre os resultados presentes entre o primeiro e o terceiro quartis no box plot, bem como as presenças de espécimes que demonstram sucesso na interação osso-implante (índice de contato de aproximadamente 80% do implante dentário - valor extremo) e ausência de tecido ósseo na superfície do implante.

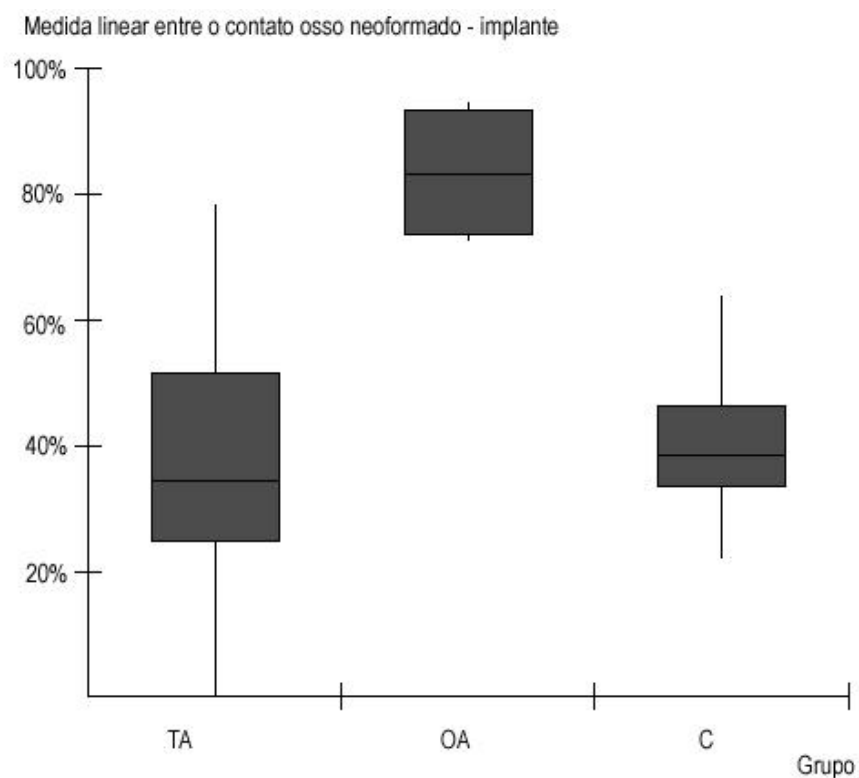


Figura 14 – Gráfico Box plot demonstrando valores percentuais da medida linear entre osso-implante

5.2. Área de tecido ósseo neoformado dentro dos limites da rosca do implante dentário

O segundo parâmetro avaliado neste trabalho refere-se ao percentual de área óssea total encontrada dentro dos limites das roscas do implante (figura 15).

Embora 6 entre 8 espécimes tratados com TA tenham mostrado satisfatório reparo ósseo, 2/6 destes casos revelaram formação óssea com características de osso medular (Figura 15 A), e 4 entre 6 espécimes demonstraram formação de osso compacto haversiano (Figura 15 B).

Já o aspecto histológico para os coelhos tratados com OA e C, demonstraram a presença de osso compacto haversiano em todos os espécimes analisados.

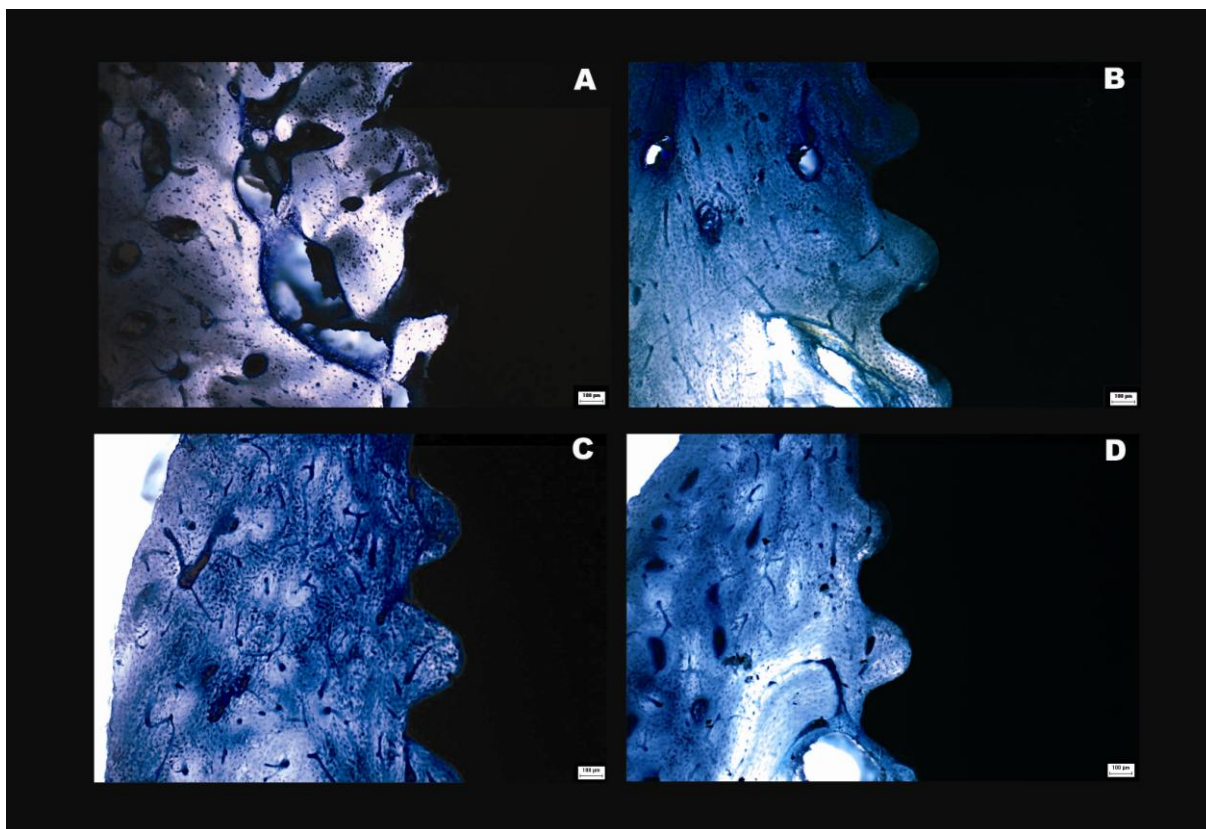


Figura 15- Análise da área óssea neoformada presente no limite das roscas dos implantes. A e B demonstram fotomicrografias de deiscências tratadas com TA. Pode-se notar em A presença de deposição óssea circundante ao implante com intensa área medular mimetizando osso esponjoso enquanto em B, ocorreu neoformação óssea haversiana. C e D evidenciam a formação óssea cortical nos grupos OA e C respectivamente (magnificação 40 ×).

Quando a mensuração das médias percentuais foi analisada, os resultados obtidos neste trabalho não demonstraram diferenças estatísticas para a neoformação óssea no interior das roscas quando comparado os três grupos.

As médias do percentual de área óssea neoformada são sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2 – Percentual de área óssea dentro dos limites das roscas do implante

Percentual de área óssea	Grupos			<i>p</i> *
	Tecido Adiposo	Osso Autógeno	Controle	
	61,48 ± 30,89 ^a	84,23 ± 11,96 ^a	72,90 ± 14,10 ^a	<i>p</i> ≤ 0,05

* Valores com o mesmo sobrescrito são estatisticamente similares (ANOVA).

Apesar de ocorrer similaridade estatística na neoformação óssea entre os grupos testados, 2 espécimes (25%) que receberam o tecido adiposo como tratamento revelaram pouca neoformação óssea (índice $< 10\%$), fato que não ocorreu tanto nos grupos OA como C. Em contrapartida, 3 espécimes (37%) revelaram formação óssea acima de 75%. Esses resultados podem ajudar a explicar que embora exista maior amplitude dos resultados percentuais no grupo TA, quando se faz uma análise em gráfico box plot (figura 16), estes não apresentam diferenças estatísticas significativas quando comparado aos grupos OA e C, que se mostraram mais homogêneos.

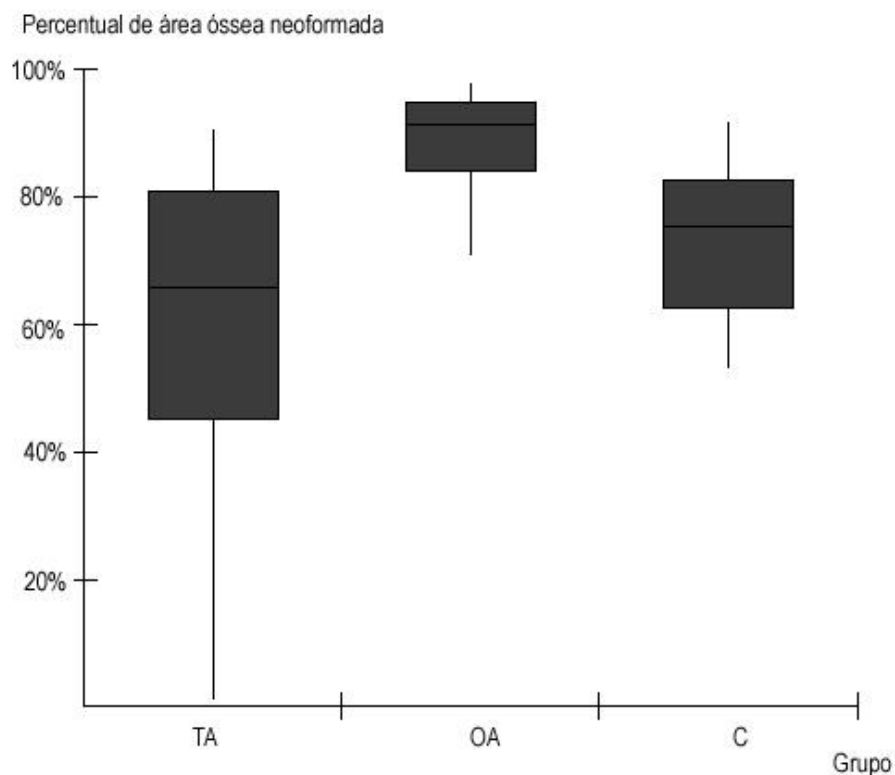


Figura 16 - Gráfico Box plot demonstrando valores percentuais da área óssea neoformada.

6. Discussão

Foi utilizado como modelo animal o coelho devido a facilidade de obtenção do tecido adiposo, por ser um animal com o custo mais acessível quando comparados aos outros modelos animais maiores, como o cão, o porco, a ovelha. Os coelhos são animais de maior porte quando comparados aos ratos ou camundongos, e com uma melhor comparabilidade com seres humanos (Di Bella, 2008). No entanto, Torres *et al.* (2007) afirmam que os animais de maior porte apresentam tecido adiposo abundante com grande potencial de células-tronco (Torres *et al.* 2007). Em contrapartida a facilidade de acesso, a quantidade de tecido adiposo apresentada no coelho, causando pequenas morbidades, torna esse animal uma boa indicação para a utilização das CTMs derivadas do tecido adiposo em estudos experimentais (Torres *et al.* 2007). Deve-se ter a cautela, contudo, com os resultados do presente estudo, pois há diferenças entre o coelho e os humanos.

Embora existam muitos estudos que avaliam o reparo ósseo em defeitos de deiscência com vários materiais de enxertia ou por procedimentos que utilizem apenas membrana para a ROG (Akagawa *et al.*, 2009; Casati *et al.*, 2002; Gurgel *et al.*, 2007), uma alternativa recentemente proposta em regeneração óssea é a possível utilização de células do tecido adiposo. No entanto, em defeitos de deiscência o tratamento por meio de enxertia de tecido adiposo ainda não foi estudado. Adicionalmente, apesar de existirem estudos sobre defeitos de deiscência, permanecem ainda as controvérsias em relação à alternativa de correção dessas situações, como a utilização da membrana e /ou enxerto ósseo (Chiapasco e Zaniboni, 2009).

Desta maneira, o presente estudo teve como proposta avaliar a quantidade de tecido ósseo reparador em defeitos de deiscências e a presença do íntimo contato entre o tecido ósseo neoformado e superfície do implante após serem tratados com enxerto de tecido adiposo e a

realização desses resultados comparados com a enxertia de osso autógeno particulado e a presença apenas de coágulo sanguíneo (grupo controle).

Vale-se ressaltar que no presente trabalho a utilização do tecido adiposo como material de enxerto ocorreu sem a realização do processamento desse tecido, ao contrário dos trabalhos de regeneração óssea relatados na literatura científica (Taub *et al.*, 2009; Di Bella *et al.*, 2008; Lendeckel *et al.*, 2004). Na maioria das vezes, o tecido adiposo coletado é processado quimicamente por ação enzimática, centrifugado, e o “pellet” (rico em células-tronco) obtido é submetido a cultura celular com o objetivo de obter linhagem celular rica em células mesenquimais indiferenciadas.

Nesse sentido, é importante enfatizar que as células do tecido adiposo *in vitro* podem se diferenciar em diversos tecidos de origem mesodérmica, que incluem: diferenciação em osteoblastos, adipócitos, células sanguíneas e condrócitos. (Zuk *et al.* 2001, Lendeckel *et al.* 2004, Weinzierl *et al.*, 2006).

A importância da utilização do tecido adiposo é que este tecido é uma importante fonte de CTMs (Condé-Green *et al.*, 2009). As CTMs são facilmente obtidas e expandidas *in vitro* e podem ser estimuladas para a diferenciação óssea (Di Bella *et al.* 2008). Similarmente como acontece *in vitro*, as CTMs podem se diferenciar em linhagens adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e miogênicas após a utilização de fatores de indução de linhagens específicas (Zuk *et al.*, 2001; Di Bella *et al.*, 2008; Kassem *et al.* 2008).

Assim, a hipótese de se utilizar enxertia de tecido adiposo aplicado diretamente no defeito ósseo surgiu com o intuito de facilitar uma futura aplicabilidade clínica e, possivelmente, reduzir os custos.

A utilização de células gordurosas derivadas da medula óssea possui desvantagem quando comparadas as derivadas do tecido adiposo intradérmica, devido a relação proporcional inversa entre a idade do paciente e quantidade de CTMs. (Weinzierl *et al.* 2006, Zuk *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, a resposta do percentual de contato osso-implante obtido com o tratamento de enxerto de tecido adiposo (TA) foi similar ao grupo C. O percentual encontrado no grupo C foi de $40,57 \pm 13,71$, enquanto que no grupo TA os valores foram de $37,75 \pm 28,03$. Resultados encontrados por Gurgel *et al.* (2007), em que os defeitos de deiscência não foram tratados com nenhum material de enxerto, nem com a utilização de membranas, a porcentagem de contato osso-implante foi de $16,52 \pm 15,96$. Esses mesmos autores quando comparados com os grupos em que foram utilizadas as membranas de e-PTFE foram de $40,86 \pm 22,73$ de contato ósseo direto.

Contudo, Chiapasco e Zaniboni (2009) afirmaram que a utilização de procedimentos de ROG são alternativas confiáveis para a correção desses defeitos. Nesse sentido, seria ideal a comparação do enxerto de tecido adiposo com um grupo em que tivesse sido utilizada uma membrana absorvível ou não-absorvível. Com isso poderíamos obter como resultados percentuais maiores aos encontrados no grupo C, o que nos remete à hipótese de que o grupo C com a utilização de membrana pudessem chegar em valores similares aos do grupo do tratado com (osso autógeno) OA. É importante ressaltar que o grupo C serviu como controle negativo, pois a idéia principal foi de comparar o resultado do TA com o grupo OA. Isso se deve ao fato de que o enxerto de osso autógeno é considerado o padrão ouro dos materiais de enxertia.

Logo, quando o osso autógeno foi comparado com o grupo em que foi realizado o tratamento do defeito com tecido adiposo, os resultados, no que se refere ao contato osso-

implante, foram estatisticamente significantes. A resposta do tecido ósseo e a superfície em que as roscas foram expostas mostraram-se com um percentual de contato maior no grupo OA ($83,37 \pm 11,85$).

Segundo Hassan *et al.*(2008), esse resultado pode ser justificado pela aptidão do osso autógeno ser responsável tanto por manter o volume da estrutura óssea, como a de desencadear a atividade osteogênica. Os resultados encontrados por esses autores identificaram que a utilização do enxerto de osso autógeno constitui ainda a melhor opção para tratamentos de deiscências quando comparados a utilização de biomateriais sintéticos.

Em contrapartida, Chiapasco e Zaniboni (2009) relataram que para a correção dos defeitos ósseos de deiscência, a utilização de enxerto ósseo autógeno não demonstra superioridade quando comparado com outros tipos de enxerto. Também adicionam que, como o osso autógeno nesses casos não apresenta melhoria nos resultados reparadores, não há a necessidade da sua utilização, uma vez que para a obtenção do mesmo expõe o paciente a uma maior morbidade.

Conforme a representação gráfica (figura 14), é interessante visualizar que a média linear do contato osso-implante nas deiscências tratadas com TA demonstraram maior heterogeneidade nos valores das amostras. Os valores percentuais variaram de 0% de contato à 80% de contato ósseo na superfície do implante dentário. Desta forma, esses resultados devem ser analisados com cautela, já que existiram respostas ósseas insatisfatórias com a utilização do tratamento com o enxerto de tecido adiposo. Já os grupos tratados com OA apresentaram resultados homogêneos, quando comparado aos demais, e a média e a mediana, percentual acima de 80% de interação do osso neoformado e o implante dentário.

A similaridade encontrada nos resultados da porcentagem da área de neoformação óssea, nos limites das roscas expostas nos três grupos, deve ser interpretada cuidadosamente,

por essa porcentagem não verificar a qualidade óssea que foi formada. A resposta de $84,23 \pm 11,96$ no grupo do OA; seguida de $72,90 \pm 14,10$ no grupo controle e $61,48 \pm 30,89$ no TA não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Foi observado por Botticelli *et al.* (2004) que em defeitos ósseos circunferenciais periimplantares houveram preenchimentos ósseos sem a utilização de materiais de enxertia, mas nos casos em que foram removidas as paredes ósseas vestibulares, não houve o reparo total, apenas houve nas bordas laterais e apicais do defeito. Isso mostra a dificuldade para o preenchimento ósseo completo em defeitos que apresentam a deiscência da parede vestibular.

No entanto, o estudo como o de Moses *et al.* (2005) apresentou resultados de preenchimento ósseo adequado em deiscências, sem diferenças estatísticas significantes. A média de porcentagem da redução da área óssea de $92,2 \pm 13,78\%$ no grupo Ossis® (membrana de colágeno); $94,6 \pm 6,69\%$ no grupo Bio-Gide® (membrana de colágeno) e $97,3 \pm 4,91$ no grupo da membrana de e-PTFE, enquanto que a porcentagem de redução da altura foi de $81,6 \pm 23,19\%$; $85,4 \pm 12,26\%$ e $93,4 \pm 9,39\%$, respectivamente.

Resultados encontrados por Akagawa *et al.* (2009), em que foi utilizado fator de crescimento fibroblástico e alguns complexos de gelatina hidrogel, sem a utilização de membranas, mostraram efetividade na regeneração óssea. Na verificação histomorfométrica os resultados encontrados por esses autores foram melhores no tipo de degradação lenta ($2,36 \pm 0,11$ mm) seguido do de degradação média ($2,03 \pm 0,40$) e complexo de degradação rápida ($1,55 \pm 0,36$ mm). É possível verificar que no tipo de degradação lenta foi acelerado o processo de regeneração óssea em implantes dentários fenestrados.

Embora neste trabalho descreva como efetivo o reparo ósseo, o aspecto histológico observado no grupo do TA difere consideravelmente. Em alguns casos o reparo apresentava-

se com intensa área medular similar ao tecido ósseo esponjoso (Figura 15A), outras vezes constituiu-se de formação de tecido ósseo cortical (figura 15B) enquanto que no grupo OA, o reparo sempre apresentou um mesmo padrão, isto é, reparo tecidual com características ósseas haversianas. A obtenção destes resultados pode ter decorrido do fato de não ter sido realizada a expansão em meio de cultura do tecido anteriormente a sua utilização. Outra possível hipótese pode se dar conforme relatam Gimble *et al.* (2006), da possível influência dos hormônios esteroidais interferirem na formação óssea e na gordura. Assim, a variação hormonal de animal para animal pode justificar a diversidade dos resultados obtidos. O tecido adiposo pode ainda ter agido como uma barreira física, deve-se considerar que a utilização do enxerto de tecido adiposo macerado poderia resultar em reparo ósseo superior aos encontrados no presente estudo.

Vale-se mencionar que quando realizada a centrifugação e a separação do “pellet” os valores encontrados de CTMs são muito pequenos no tecido adiposo, de aproximadamente de $2-6 \times 10^8$ células em 300 centímetros cúbicos de tecido lipoaspirado (Zuk *et al.*, 2001). Os resultados encontrados por Lendechel *et al.* (2004) foram que as CTMs que estão contidas no tecido adiposo após a realização de processamento desse tecido apresentaram em torno de 2 a 3 % de células-tronco.

Nos estudos em que foi utilizado o processamento do tecido adiposo e posteriormente utilizados meios de cultura, foram obtidas respostas favoráveis. O estudo experimental de Zheng *et al.* (2006), sugere a capacidade de reparo em osso e cartilagem após a realização do processamento e utilização de meios de cultura com influência da BMP4 (proteína morfogenética óssea 4 - do inglês bone morphogenetic protein 4) *in vivo*. Weinzierl *et al.* (2006) mostrou áreas de matriz mineralizada e a presença de osteoblastos e células produzindo osteocalcina após a criação de agregados tridimensionais cultivados *in vitro*, com

diferenciação osteogênica. A utilização de tecido adiposo é justificada por apresentarem as CTMs, que são células que dão origem aos osteoblastos (Kassem *et al.* 2008).

Adipócitos são capazes de se diferenciar em células formadoras de osso. A diferenciação de adipócitos preenchidos com lipídios em células, parecidas com fibroblastos, é capaz de se diferenciar em outras células formadoras de osso ou em adipócitos multiloculares. Isso confirma a capacidade de plasticidade da célula entre fenótipos osteoblásticos e fenótipos adipócitos. A interconversão de adipócitos em osteoblastos exige a formação por meio de uma etapa intermediária de células parecidas com os fibroblastos, que são semelhantes morfologicamente aos pré-adipócitos. A capacidade dos adipócitos em formar osso foi dependente da indução por meio de fatores osteogênicos, promovendo diferenciação osteoblástica. Assim, os adipócitos requerem uma indução anteriormente em meio osteogênico antes de formar osso (Justesen *et al.* 2004). Adicionalmente, o estudo da biologia dos osteoblastos é necessário para fornecer informações fundamentais para se controlar tanto a remodelação quanto a manutenção óssea (Kassem *et al.* 2008).

As expectativas futuras, segundo Caplan (2005), são de que a expansão das células fora do corpo, *in vitro*, irão resultar em novas estratégias biotecnológicas, que irão reparar os danos do organismo com células que induzirão a neoformação de novos tecidos, integrando o tecido hospedeiro, com a idéia de que sejam capazes quantificar o volume ideal, bem como estimar o tempo necessário para facilitar o reparo da regeneração.

7. Conclusão

1. A resposta óssea do osso autógeno apresentou resultados superiores quando comparados aos demais grupos. Apresentou íntimo contato do osso e a superfície do implante dentário, com áreas ósseas com características haversianas.
2. O enxerto de tecido adiposo apresentou áreas ósseas com características haversianas, mas ao mesmo tempo áreas intensas de osso medular.
3. Para que possa ser utilizado no futuro em novas pesquisas com este desenho de estudo, o tecido adiposo aparenta necessitar previamente do processamento e cultura *in vitro*.

REFERÊNCIAS¹

- Akagawa Y, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. Initial bone regeneration around fenestrated implants in beagle dogs using basic fibroblast growth factor–gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *J Prosthodont Res* 2009;53:41-7.
- Araujo MG e Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005;32:212-8.
- Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Resolution of bone defects of varying dimension and configuration in the marginal portion of the peri-implant bone. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2004;31:309-17.
- Caplan AI. In: Lanza R. *Essentials of stem cell biology*. London: Elsevier; 2009. p. 243-8.
- Caplan AI, Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*. 2005;11(7/8): 1198-211.
- Casati MZ, Sallum EA, Nociti Junior FH, Cafesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol* 2002;73(7):789-96.
- Chiapasco M e Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20(4):113-23.
- Condé-Green A, Amorim NFG, Pitanguy I. Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study. *Journal of Plastic, Reconstr Aesthet Surg* 2009:1-7.
- Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(4):483-9.
- Gimble JM, Zvonic S, Floyd E, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006;98:251-66.
- Gurgel BCV, Gonçalves PF, Pimentel SP, Ambrosano GMB, Nociti Junior Fh, Sallum EA, *et al*. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. *Clin Oral Imp Res* 2007;18:649-54.
- Hassan KS, Kassim A, Ogaly AA. A comparative evaluation of immediate dental implant with autogenous versus synthetic guided bone regeneration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e8-e15.

¹ De acordo com a norma da Universidade Positivo, baseada no estilo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com a base de dados MEDLINE.

- Justesen J, Pedersen S, Stenderup K, Kassem M. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells *in vitro* and *in vivo*. *Tissue Eng* 2004; 10(3/4):381-91.
- Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:183-7.
- 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;6:1135-50.
- Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, *et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniofac Surg* 2004;32:370-3.
- Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Impl Res* 2005;16:210-9.
- Papadopoulos H e Edwards RS. En bloc autogenous fat graft harvest from the anterior iliac crest. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:704-5.
- Qu C, Zhang G, Zhang L, Yang G. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Animal 2007;43:95-100.
- Rose Jr JG, Lucarelli MJ, Lemke BN, Dortzbach RK, Boxrud CA, Obagi S, Patel S. Histologic comparison of autologous fat processing methods. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2006;22(3):195-200.
- Sadick NS e Hudgins L. C. Fatty Acid Analysis of transplanted Adipose Tissue. *Arch Dermatol* 2001;137:723-7.
- Sennerby L, Thomsen P, Ericsson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:62-71.
- Siciliano VI, Salvi GE, Matarasso S, Cafiero C, Blasi A, Lang NP. Soft tissues healing at immediate transmucosal implants placed into molar extraction sites with buccal self-contained dehiscences. A 12-month controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20:482-8.
- Taub PT, Yau J, Splangler M, Mason JM, Lucas PA. Bioengineering of calvaria with adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2009;123(4):1178-85.
- Tobita M, Uysal AG, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008;14(6):945-53.
- Torres FM, Rodrigues CJ, Stocchero IN, Ferreira MC. Stem cells from the fat tissue of rabbits: An easy-to-find experimental source. *Aesth Plast Surg* 2007;31:574-8.
- Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;34(8):466-71.

Zheng B, Cao B, Li G, Huard J. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation *in vitro* but Primarily Osteogenic and chondrogenic differentiation *in vivo*. Tissue Eng 2006;12(7):1891-1901.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001;7(2):211-26.

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 3.300
Fone: (41) 3317-3260 ou 3317-3290
Fax: (41) 317-3030
cep@up.edu.br

PROTOCOLO Nº 130 /2008

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE POSITIVO

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Utilização de células tronco de tecido adiposo no tratamento de defeitos de deiscência ao redor de implantes: estudo histomorfométrico em coelhos.
2. Professor orientador: Cícero de Andrade Urban
3. Aluno(s) envolvido(s): Fernanda Missao Brugin Matsubara
4. Instituição do pesquisador: Universidade Positivo
5. Local onde será realizada a pesquisa: Universidade Positivo

OBJETIVO
7. Avaliar histomorfometricamente a regeneração óssea de defeitos tipo deiscência criados cirurgicamente ao redor de implantes e tratados com osso autógeno de células-tronco originadas de tecido adiposo.

SÍNTESE DO PROJETO
8. Serão utilizados 15 coelhos machos com idade média de 6 meses, pesando 4 Kg. Para o procedimento cirúrgico, os animais serão sedados com associação de 2mg/Kg de Midazolam e 0,3ml/Kg de Fentanil aplicada via intramuscular. A indução anestésica será feita com a associação de 50mg/Kg de Cloridrato de Quetamina e 15mg/Kg de Cloridrato de Xilazina. A manutenção do plano anestésico será feita pela vaporização de Isoflurano. Para o controle da dor pós-operatória os animais receberão fentanil e dipirona sódica 1x/dia durante 3 dias e 800 mg/Kg de amoxicilina 1x/dia durante 5 dias. Serão produzidos defeitos ósseos nas tíbias dos coelhos em formato de taça com 6 mm de diâmetro. Em seguida, serão inseridos os implantes de titânio com 3,3 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento. Os animais serão divididos em 3 grupos de acordo com o tratamento para os defeitos perimplantares: grupo tratado com osso autógeno, grupo tratado com células tronco originárias do tecido adiposo e grupo controle tratado com coágulo sanguíneo. O osso autógeno será obtido a partir de raspagem de uma região 3 cm distante do defeito. A gordura será removida da base do crânio a partir de uma incisão com 2 a 3 cm e processada a fim de se obter as células tronco. Os animais serão mantidos por 3 meses quando, então, serão radiografados e mortos por injeção de barbitúrico. Após a morte serão removidos blocos ósseos da mandíbula que serão devidamente tratados para a análise histomorfométrica.

COMENTÁRIOS DO RELATOR
9. A justificativa apresentada pelos pesquisadores é satisfatória. Assim sendo, sou de parecer favorável ao desenvolvimento da pesquisa.

PARECER FINAL
☒ Recomenda a aprovação ☐ Não recomenda a aprovação ☐ Em pendência ☐ Aprovado com recomendação
10. Solicita-se o envio de relatório final ou da publicação com os resultados da pesquisa. Este parecer não contempla a aprovação orçamentária do projeto.


GABRIELA FERNANDA TORRES
COORDENADORA



ANEXO 2

Randomização das cirurgias dos animais.

COELHO 1 GCd OAe	30/07 1F	COELHO 7 TAd GCe	22/09 7F	COELHO 13 OAd TAe	05/10 13F
COELHO 2 TAd GCe	31/07 2F	COELHO 8 OAd TAe	29/09 12F	COELHO 14 GCd OAe	05/10 14F
COELHO 3 OAd TAe	28/09 5F	COELHO 9 GCd OAe	17/09 6F	COELHO 15 TAd GCe	05/10 15F
COELHO 4 GCd OAe	28/09 4F	COELHO 10 TAd GCe	28/09 10F	COELHO 16 OAd TAe	06/10 17F
COELHO 5 TAd GCe	20/08 3F	COELHO 11 OAd TAe	29/09 11F	COELHO 17 GCd OAe	06/10 16F
COELHO 6 OAd TAe	22/09 8F	COELHO 12 GCd OAe	24/09 9F	COELHO 18 TAD GCE	08/10 18F

Legenda:

GC = Grupo Controle

d = Lado Direito

OA = Osso Autógeno

e = Lado Esquerdo

TA = Tecido Adiposo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)