

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**QUANTIFICAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO OSSO
AUTÓGENO + CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS IMPLANTADOS EM
DEFEITO ÓSSEO NO RATO TRATADO COM CAFEÍNA.**

Rander Moreira Macedo

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RANDER MOREIRA MACEDO

**QUANTIFICAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO OSSO
AUTÓGENO + CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS IMPLANTADOS EM
DEFEITO ÓSSEO NO RATO TRATADO COM CAFEÍNA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Pulo para obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Brentegani

Ribeirão Preto

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Macedo, Rander Moreira

Quantificação do potencial osteogênico do osso autógeno + células osteoblásticas implantados em defeito ósseo no rato tratado com cafeína. Ribeirão Preto, 2009.

168 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Brentegani, Luiz Guilherme.

1. Reparação óssea.
2. Cafeína.
3. Células osteoblásticas.
4. Osso autógeno.
5. Histometria.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rander Moreira Macedo

Quantificação do potencial osteogênico do osso autógeno + células osteoblásticas implantados em defeito ósseo no rato tratado com cafeína.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

À **Deus**, que sempre norteou meu caminho. Deu-me forças nos momentos de cansaço; bom senso, sabedoria e discernimento nos momentos de dúvida.

Aos meus maravilhosos pais, **Dasy Lúcyde Moreira Macedo**, pelo carinho, amor e renúncia em prol da dedicação suprema aos filhos, e **Rogério Macedo**, também pelo amor, amizade e sempre fazendo o impossível para que os nossos sonhos se tornassem reais.

Aos meus irmãos **Breno Moreira Macedo** e **Ruan Moreira Macedo**, por serem os meus melhores amigos e sempre estarmos unidos seja nas horas de fracasso ou de vitórias.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Luiz Guilherme Brentegani**, pelo exemplo de caráter, educação e honestidade. Sempre disposto a dividir seus conhecimentos, os anos de convívio desde a iniciação científica me propiciaram enriquecer tanto intelectualmente quanto humanamente, observando o seu jeito único e paciente de tratar as pessoas seja nas questões acadêmicas ou no cotidiano. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, **Elpídio Macedo** (in memória) e **Maria Ivete Macedo, Ivadir Faria Moreira** e **Dilma Helena Lourenço Moreira**, pelo exemplo de superação das dificuldades enfrentadas na vida e pelo êxito em formar famílias tão brilhantes.

Às minhas tias **Denise, Delvânia, Rejane**, e tios **Celso e Décio**, por estarem sempre presentes e vibrantes com minhas conquistas.

Aos meus Primos **Thiago, Caio, Pablo e Denis**, pelos momentos de descontração e união vividos juntos.

À minha namorada **Raquel Antonio Carros**, pela paciência, companheirismo e doçura nos momentos ao seu lado.

À **Prof. Dra. Suzie Aparecida de Lacerda**, pela criteriosa e fundamental colaboração, nas diversas fases da execução deste trabalho, além da amizade construída durante os anos de estágio no CAEDO.

À **Prof. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato do Prado**, pela gentileza em elaborar as células tronco utilizadas nesta pesquisa e pela prontidão em solucionar minhas dúvidas.

Aos técnicos do laboratório de histopatologia, **Antônio, Edna e Gilberto**, pela paciência e dedicação na confecção das lâminas histológicas e **Adriana**, pela companhia e auxílio durante os procedimentos cirúrgicos realizados nos animais.

Aos técnicos **Serginho e Massaro**, pelo amor e os impecáveis cuidados com os animais no biotério.

Às alunas de iniciação científica **Adriana, Juliana e Jaqueline**, pelo tempo gasto no tratamento dos animais nos finais de semana em que me ausentava.

À Doutoranda **Celina Antonio Prata**, pela ajuda em diversas etapas deste estudo.

Aos Colegas da pós-graduação, **Carol, Daniela, Marina, Diogo, Flávio, Leandro e Rodrigo**, por possibilitarem bons momentos nesta trajetória.

À secretária da Reabilitação Oral, **Regiane de Cássia Tirado Damasceno**, pelo prontidão e disponibilidade em resolver as questões por mim solicitadas.

Às secretárias da pós-graduação, **Isabel Cristina C. Galino e Regiane Cristina Moi Sacioloto**, pelos cuidados e atenção aos quesitos burocráticos deste curso de pós-graduação.

Aos Departamentos de **Materiais Dentários e Prótese e de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia**, pelo acolhimento e por possibilitarem o desenvolvimento desta dissertação.

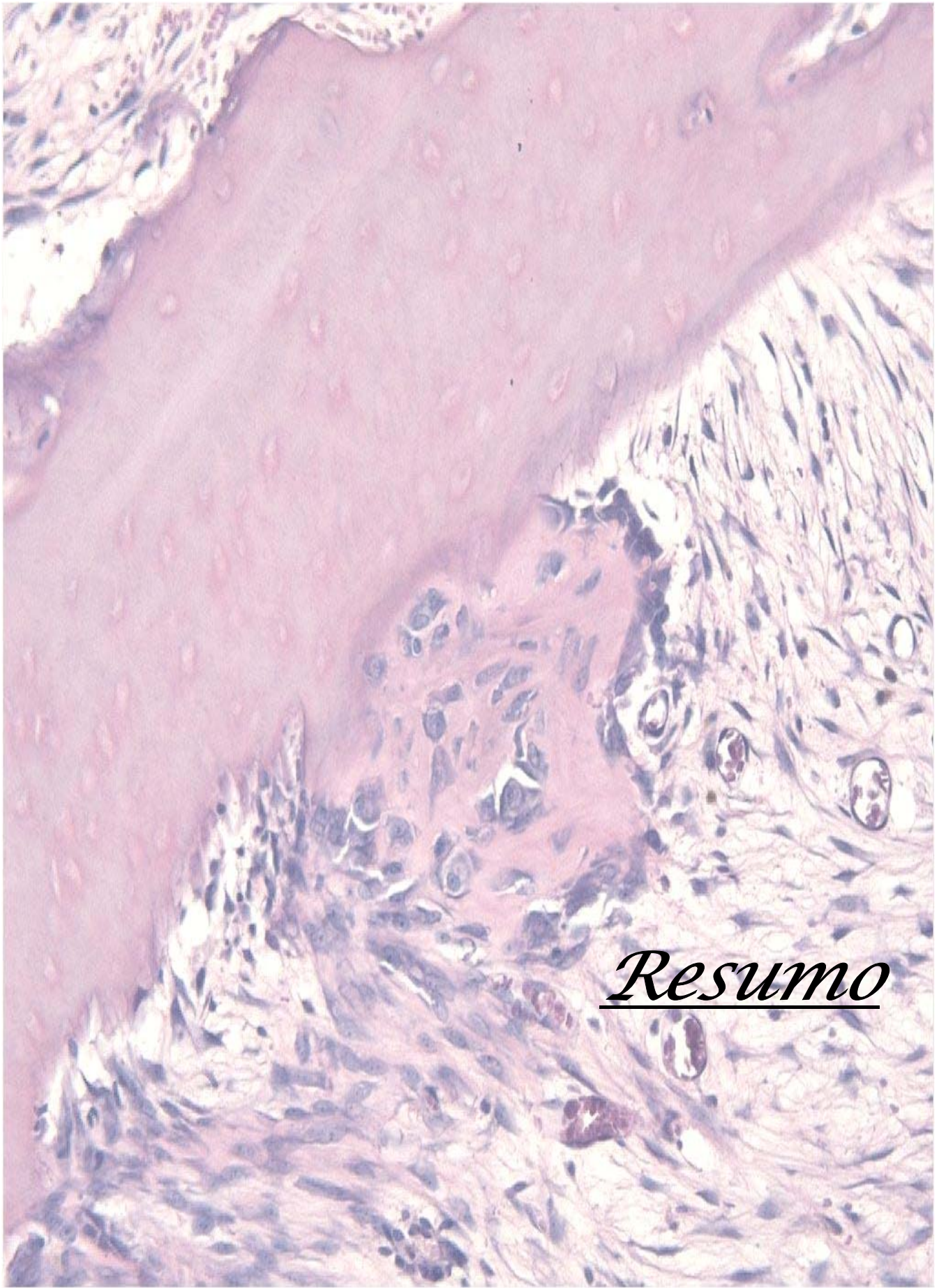
Às secretárias do departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, **Rosângela A. da Silva Troca Nascimento e Filomena L. Placciti**, pela prontidão e atenção durante este período.

Aos amigos da Cirurgia Bucomaxilofacial, **Jorge Luiz J. L. Junior, Alice Dias Petri e Marcelo Rodrigues Azenha**, pelos bons momentos vividos juntos no CAEDO e pela paciência ao dividirem comigo seus conhecimentos de cirurgia.

Aos **Animais** utilizados nesta pesquisa por cederem o bem mais precioso, a vida.

O estudo, a busca da verdade e da beleza
são domínios em que nos é
consentido sermos crianças por toda a vida.

Albert Einstein



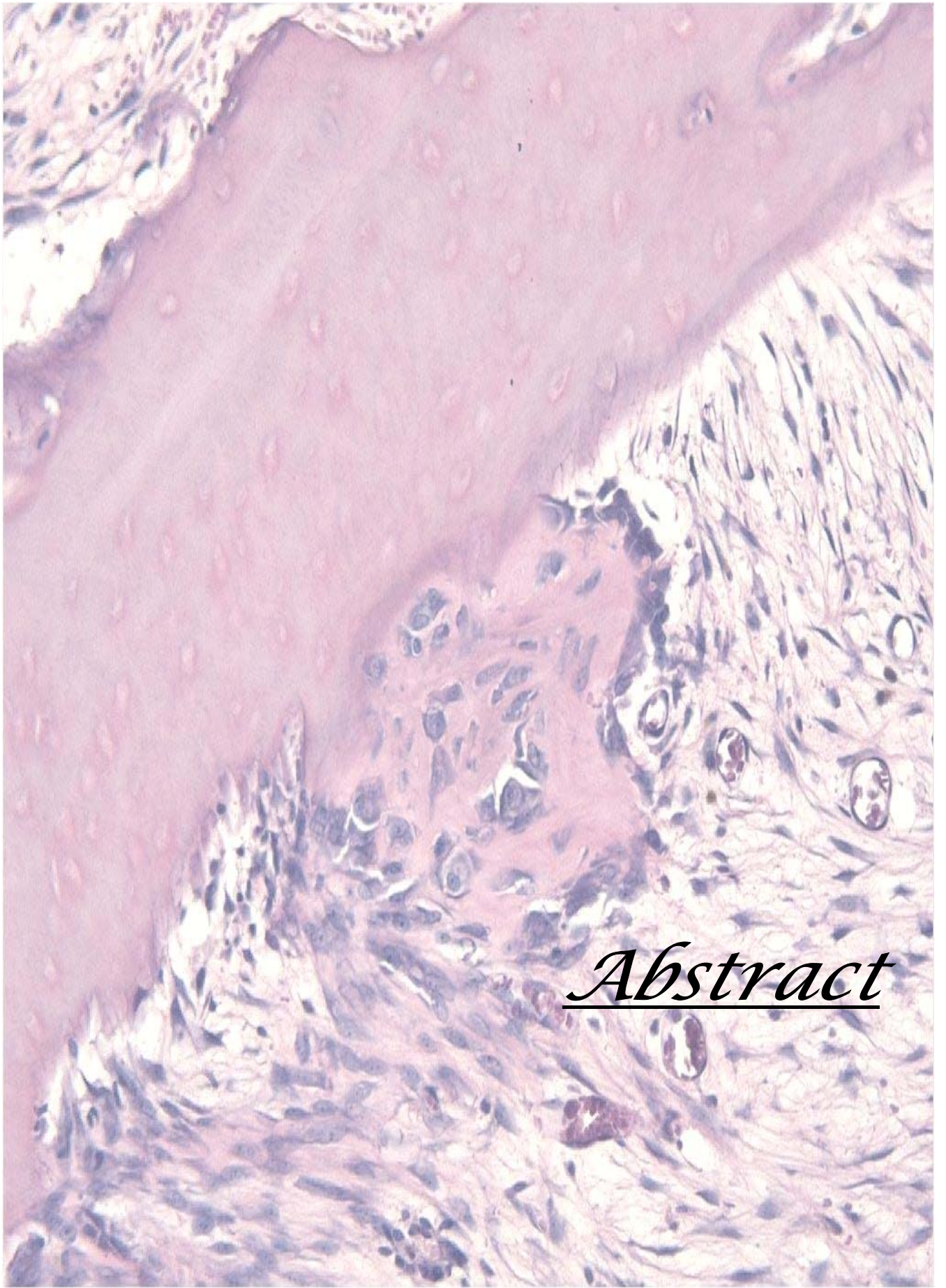
Resumo

MACEDO, R.M. **Quantificação do potencial osteogênico do osso autógeno + células osteoblásticas implantados em defeito ósseo no rato tratado com cafeína.** 2009. 168 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

Resumo

Estudos sugerem que a cafeína atua sobre o osso promovendo aumento da excreção de cálcio e inibição da proliferação de osteoblastos, aumentando o risco de fraturas, osteoporose e doença periodontal. Os efeitos da cafeína sobre o tecido ósseo dificultam a aplicação de implantes dentários devido à presença de grandes defeitos ósseos ou volume ósseo insuficiente. Vários métodos são propostos para a regeneração de defeitos ósseos, entre eles, o uso de diferentes tipos de enxertos, os quais demonstram capacidade em promover a formação óssea. Apesar das desvantagens, o osso autógeno ainda é considerado a referência padrão como enxerto ósseo, devido ao seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor. A engenharia tecidual óssea tem sido utilizada como uma estratégia para a regeneração óssea. As células tronco mesenquimais são consideradas multipotentes e podem replicar como células indiferenciadas, possuindo potencial para se diferenciarem em linhagens de osso, cartilagem, gordura e cartilagem. O objetivo deste estudo foi quantificar histomorfometricamente a reparação óssea pelo enxerto de uma associação de osso autógeno obtido da calota craniana e células osteoblásticas em defeitos ósseos produzidos pela extração dental de ratos submetidos à administração diária de cafeína. Os animais foram divididos em: Controle (c), osso autógeno (oa) e osso autógeno + células osteoblásticas (oa+co) e receberam injeções diárias intraperitonealmente de 30 mg/kg/dia de cafeína durante trinta dias, os homólogos receberam de solução salina. Os ratos foram sacrificados nos períodos de 7, 21 e 42 dias pós-cirurgia e as amostras teciduais foram processadas para a obtenção de secções finas (5 µm) e coradas com HE. Através de um sistema de análise de imagens se estimou a fração de volume de osso, conjuntivo e coágulo, no defeito ósseo. Os resultados histológicos e histométricos mostraram que nos animais sob tratamento com cafeína houve uma menor formação óssea estatisticamente significativa a 1%, e um retardo na reabsorção do coágulo sanguíneo quando comparado aos alvéolos dos animais sob tratamento com soro fisiológico. A análise qualitativa do fragmento de osso autógeno isoladamente ou associado às células osteoblásticas mostrou uma osteointegração progressiva e sem reação de corpo estranho nos animais tratados com soro fisiológico e, as células implantadas não propiciaram reações imunogênicas nem a formação tumoral, possibilitando um aumento (25%) na reparação óssea dos animais tratados com a cafeína. Conclui-se que o enxerto/implante das células osteoblásticas associadas ao osso autógeno da calota craniana foi capaz de compensar, nos períodos tardios, os efeitos deletérios da cafeína na reparação óssea alveolar.

Palavras chaves: Reparação óssea, cafeína, células osteoblásticas, osso autógeno, histomorfometria.



Abstract

MACEDO, R.M. **Quantification of the osteogenic potential of autogenous bone + osteoblastic cells implanted in bone defect in rats treated with caffeine.** 2009. 168 p. Thesis (Master) – Ribeirão Preto School of Dentistry, São Paulo University, 2009.

Abstract

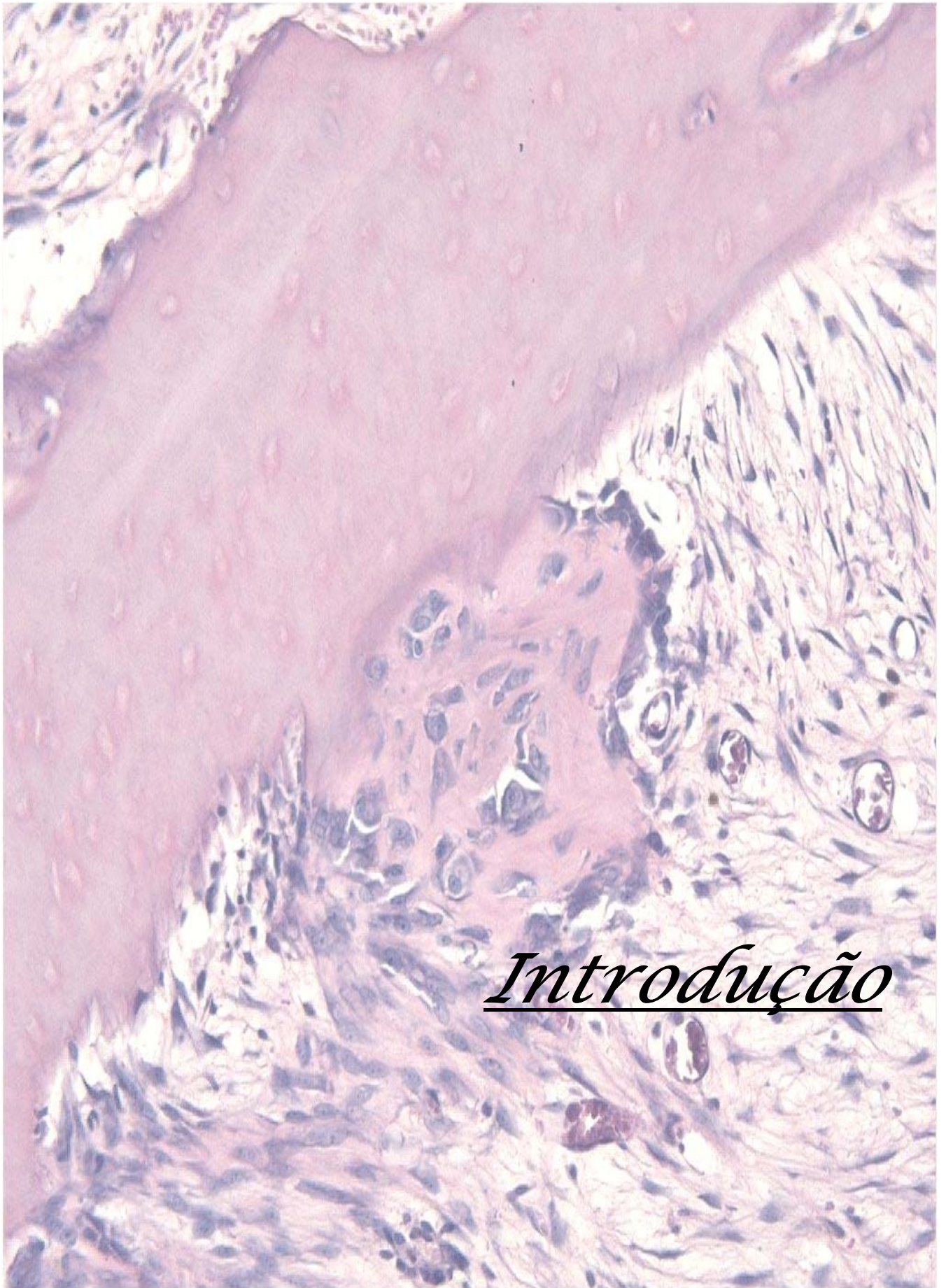
Studies suggest that caffeine acts on the bone for increasing the excretion of calcium and inhibition of osteoblasts proliferation, increasing the risk of fractures, osteoporosis and periodontal disease. The effects of caffeine on bone difficult the application of dental implants due to large bone defects and insufficient bone volume. Several methods are proposed for the regeneration of bone defects, including the use of different types of grafts, which show ability to promote bone formation. Despite the disadvantages, the autogenous bone is still considered the gold standard as bone graft because the potential osteogenic, osteoinductive and osteoconductive. The bone tissue engineering has been used as a strategy for bone regeneration. The mesenchymal stem cells are considered multipotent and can replicate as undifferentiated cells, with potential to differentiate into lineages of bone, cartilage, fat and cartilage. This study aimed to quantify histomorphometrically bone repair by grafts of a combination of autogenous bone obtained from the skull and osteoblastic cells in bone defects produced by dental extraction in rats subjected to daily administration of caffeine. The animals were divided into: Control (c), autogenous bone (ab) and autogenous bone + osteoblastic cells (ab + oc) and received daily injections intraperitoneally of 30 mg/kg/day of caffeine for thirty days, the counterparts received saline solution. The rats were sacrificed at times of 7th, 21st and 42nd days post-surgery and tissue samples were processed to obtain thin sections (5 µm) and stained with HE. Through an image analysis system was estimated the fraction of volume of bone, collagen and blood clot in the bone defect. The histological and histometric results showed that in animals under treatment with caffeine had a lower bone formation statistically significant at 1%, and a delay in the resorption of blood clots when compared to the alveoli of animals under treatment with saline. The qualitative analysis of the fragment of autogenous bone alone or associated with osteoblastic cells showed a progressive osteointegration and no foreign body reaction in animals treated with saline, and implanted the cells not provided immunogenic reactions or tumor formation, allowing an increase (25%) on bone repair in animals treated with caffeine. It was concluded that the graft/implant of osteoblastic cells associated with autogenous bone from the skull was able to compensate in later periods, the deleterious effects of caffeine on alveolar bone repair.

Keywords: Bone Repair, caffeine, osteoblastic cells, autogenous bone, histomorphometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Reparação Óssea	20
2.2 Cafeína	30
2.3 Osso Autógeno	35
2.4 Células Tronco.....	49
2.4.1 Conceitos, Origens, Definições e Propriedades	49
2.4.2 Medula óssea e células tronco	52
2.4.3 Células tronco e a reparação óssea.....	54
3. PROPOSIÇÃO	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1 Animais Utilizados	64
4.2. Protocolo Experimental.....	64
4.3 Cultura de Células de Medula Óssea de Ratos	66
4.4 Extração Dentária	68
4.5 Coleta do Osso Autógeno.....	70
4.6 Implante dos Biomateriais.....	73
4.7 Sacrifício e Coleta do Material	75
4.8 Procedimento Histológico	76
4.9 Análise Histomorfométrica dos Alvéolos.....	76
4.10 Análise Estatística	78
5. RESULTADOS.....	80
5.1. Resultados Histológicos.....	80
5.1.1. 7 dias.....	80
5.1.2. 21 dias.....	85
5.1.3. 42 dias.....	90
5.2. Resultados Histométricos	95
5.2.1. Tecido Ósseo	95
5.1.3. Tecido Conjuntivo.....	101
5.1.4. Coágulo Sanguíneo.....	107

6. DISCUSSÃO	114
6.1. Cafeína e Reparação Óssea	114
6.2. Osso Autógeno e Reparação Óssea	125
6.3. Células Tronco e Reparação Óssea	131
7. CONCLUSÕES	139
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
9. APÊNDICE	166
10. ANEXO	168



Introdução

1. Introdução

A cicatrização alveolar é um fenômeno complexo, porém ordenado, que envolve vários processos, inclusive uma resposta inflamatória estreitamente entrelaçada com o reparo. Estes processos podem ser modificados por várias influências conhecidas ou não, freqüentemente impedindo a qualidade tanto da resposta inflamatória como do reparo. Estas influências incluem fatores locais e sistêmicos. Entre os fatores locais mais citados, estão: infecção local, traumas mecânicos, presença de corpos estranhos, assim como o tamanho e localização da ferida. Os fatores sistêmicos são: deficiência nutricional, alterações metabólicas, alterações circulatórias e hormonais, ingestão de substâncias químicas, e outros (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

Os estudos do reparo ósseo intra-alveolar em diferentes espécies animais descrevem a seqüência de alterações celulares e tissulares, que culmina com o completo preenchimento do alvéolo dental por tecido ósseo neoformado (CARVALHO; OKAMOTO, 1987; LIN; MCCULLOUGH; CHO, 1994; BRENTGANI; BOMBONATO-PRADO; LAMANO-CARVALHO, 1996; LAMANO-CARVALHO; BRENTGANI; BOMBONATO-PRADO, 1997). A reparação alveolar se completa quando o alvéolo dentário apresentar-se preenchido por trabéculas ósseas espessas e espaços medulares diminutos, e a crista alveolar remodelada (ALVES; OKAMOTO, 1989).

Vários estudos demonstram que os efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo, ainda são controversos (LLOYD et al., 1997), mas sabe-se que seu consumo está relacionado com o aumento de risco de fraturas de ossos osteoporóticos e doenças periodontais (KAMAGATA-KIYOURA et al., 1999). Em geral, o potencial de

impacto desta droga sobre o osso é devido à sua capacidade em aumentar a excreção de cálcio (MASSEY; WHITING, 1993).

Os efeitos da cafeína sobre o tecido ósseo dificultam a aplicação de implantes dentários devido à presença de grandes defeitos ósseos ou volume ósseo insuficiente. Nestes casos, é necessário que o defeito seja restaurado ou o osso aumentado com o objetivo de obter a posição correta e suficiente retenção para o implante (ZERBO et al., 2001).

Vários métodos são propostos para a regeneração de defeitos ósseos, entre eles, o uso de diferentes tipos de enxertos, os quais demonstram capacidade em promover a formação óssea. Entretanto, muitos deles não são ideais e muitos não serão substituídos por osso durante muitos anos, se é que serão (SY, 2002).

O osso autógeno é considerado a referência “gold standard” como enxerto ósseo, devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico (SANADA et al., 2003), atuando por osteoindução e osteocondução (ELLIES, 1992). Dessa forma, atua como modelo para a neoformação óssea (MANSO; LANG, 1997). Tanto enxertos com osso autógeno compacto ou poroso contêm em sua matriz orgânica, osteócitos, osteoclastos, osteoblastos e proteínas osteogênicas, apresentando potencial para osteogênese quando usado para melhorar ou corrigir defeitos ósseos (BLOCK; KENT, 1997; MERKX et al., 1999; ORR et al., 2001; KIYOKAWA; TANAKA; INOUE, 2002).

O enxerto de osso autógeno é ainda um dos procedimentos cirúrgicos mais utilizados diante da necessidade de reconstrução de defeitos ósseos. Enquanto o emprego de enxertos autógenos mostra vantagens em relação às demais técnicas no que se refere à biocompatibilidade e ao potencial regenerador ósseo (BOYNE, 1999), a experiência clínica e trabalhos experimentais mostram limitações quanto ao

ganho efetivo de volume ósseo ao longo do tempo (SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002).

Devido às limitações dos diversos materiais de enxerto, mais recentemente os pesquisadores têm utilizado a engenharia tecidual óssea como uma estratégia para a regeneração óssea (ABUKAWA et al., 2004).

As células tronco mesenquimais são consideradas multipotentes e podem replicar como células indiferenciadas, possuindo potencial para se diferenciarem em linhagens de tecido mesenquimal, incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão, músculo e estroma medular, e que ultimamente tem recebido ampla atenção devido a sua utilidade potencial na aplicação da bioengenharia tecidual (OWEN; FRIEDENSTEIN, 1988; PITTENGER et al., 1999; WANG et al., 2003).

Considerando ser a osteogênese o resultado da ação dos osteoblastos, nós acreditamos que a bioengenharia tecidual óssea construída pelos osteoblastos associados ao osso autógeno, possa ser um enxerto ósseo ideal com referência à osteogênese, osteoindução e osteocondução.



Revisão de Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1 REPARAÇÃO ÓSSEA

Os estudos da reparação óssea que se segue à extração dental, realizados em humanos e em diferentes espécies animais, descrevem a seqüência de alterações celulares e tissulares, bem como a cronologia do processo, que culmina com o completo preenchimento do alvéolo dental por tecido ósseo neoformado.

Em 1960, Amler et al. descreveram a reparação alveolar através de estudos feitos com biópsias de feridas de extração dental humanas, como um processo que pode ser dividido nas seguintes fases: 1) logo após a exodontia ocorre a formação do coágulo; 2) em seguida ocorre a substituição do coágulo por tecido de granulação; 3) este tecido de granulação é substituído por tecido conjuntivo; 4) ocorre então a formação de um tecido osteóide, principalmente no ápice do alvéolo e depois, em toda extensão do alvéolo, partindo do ápice para região cervical; 5) amadurecimento da matriz óssea e 6) epitelização da ferida cirúrgica.

Okamoto e Russo em 1973 observaram e descreveram a reparação alveolar em ratos num período de 21 dias, em intervalos de 3 em 3 dias. Dividiram o processo em 3 fases distintas: período de formação de coágulo e proliferação de células, período de formação de tecido conjuntivo e período de ossificação. Ao final de 21 dias o alvéolo estava completamente preenchido com tecido ósseo.

Em 1987, Carvalho e Okamoto acrescentaram, ainda com finalidade didática, uma 4ª fase à reparação alveolar. Esta fase representa, para os autores, a fase de maturação do tecido conjuntivo que acontece antes da fase de ossificação.

Lin et al. (1994) em análise histológica detalhada da evolução do reparo alveolar mostra que, o coágulo sanguíneo que preenche o alvéolo imediatamente após a extração dental, é progressivamente reabsorvido e invadido por fibroblastos derivados do ligamento periodontal residual, estes produzem fibras colágenas, que segundo Devlin e Sloan (2002), são do tipo I e III, criando assim uma fonte para a formação óssea subsequente.

Lin, et al. (1994), Devlin e Sloan (2002) relatam evidências de que, ambos fibroblastos do ligamento periodontal e células osteoprogenitoras do osso circunvizinho são importantes para a diferenciação osteoblástica, levando assim à substituição de tecido conjuntivo por osso novo.

Lin et al. (1994), Okamoto et al, (1994) e, Kumar, Abbas e Fausto (2005) mostram que para a adequada sucessão dos eventos reparativos, os macrófagos são essenciais, pois reabsorvem o coágulo para este tecido sofrer a maturação com a progressiva aposição de colágeno e reprodução de matriz óssea pelos osteoblastos.

Lamano-Carvalho et al. (1997a) em análise histométrica, analisaram a cronologia da reparação alveolar em ratos após exodontia. Observaram que a neoformação óssea continua após 21 dias da extração dental, tempo considerado por outros autores como final do processo. Nos resultados, até a 6ª semana (42 dias) ainda ocorre formação de tecido ósseo no terço cervical do alvéolo.

Jahangiri et al, (1998) e, Devlin e Sloan (2002), mostraram que os novos fibroblastos produzidos pela diferenciação das células progenitoras e mitoses de fibroblastos pré-existentes, sobre a influência de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas (PDGF), sintetizam uma delicada matriz que associada à formação de novos capilares caracterizam o tecido de granulação. Este tecido conjuntivo

imaturu que se forma a partir das margens do alvéolo em direção ao centro é gradualmente substituído por um tecido conjuntivo maduro e mais tarde por trabéculas ósseas neoformadas na mesma direção centrípeta.

A reparação alveolar tem sido investigada em numerosas condições experimentais, no sentido de observar possíveis fatores, locais ou sistêmicos, que possam interferir com o processo, acelerando-o ou retardando-o.

Quanto as interferências sistêmicas no processo de reparo ósseo, Shoji et al. (2000), avaliaram as interferências da gravidez e amamentação, bem como a quantidade de Cálcio na alimentação de ratas, sobre a densidade mineral óssea alveolar. Os autores observaram que, a densidade mineral óssea alveolar diminuiu baseado na concentração de Ca na dieta, mas a magnitude desse declínio foi muito mais expressiva no grupo das ratas prenhas e amamentando do que das não prenhas.

Teófilo, Brentegani e Lamano-Carvalho em 2001, observaram uma redução de 20 a 30% no trabeculado ósseo intra-alveolar 7 dias após a extração, em ratos tratados com amlodipina, um inibidor dos canais de cálcio.

Bombonato-Prado et al. (2004), mostraram através de análise histomorfométrica, uma menor neoformação óssea alveolar quando ratos eram submetidos a ingestão crônica de bebida alcoólica.

Gau et al. (2005), também através de análise histométrica, estudou os efeitos da administração oral de ciclosporina A, um imunossupressor, no metabolismo óssea alveolar pós-extração. Este medicamento age na supressão específica da subpopulação de células-T, utilizado principalmente pós-transplante de órgãos. No reparo ósseo alveolar houve prejuízo quanto à reparação, pois nos períodos de 10 e

14 dias pós-cirúrgicos observou-se menor quantidade de tecido osteóide no grupo tratado com este medicamento.

Okamoto et al. (2006), realizou um estudo cujo objetivo foi observar o efeito da desidratação crônica no reparo alveolar. Ratos foram mantidos em um regime de privação de água por 9 dias, sendo 3 dias antes da extração e 6 dias pós-extração. Observou-se nos ratos com hidroprivação, um coágulo desorganizado com discreto número de macrófagos e baixa quantidade de tecido conjuntivo neoformado, o que levou a um profundo atraso na substituição de tecido conjuntivo por tecido ósseo.

A deficiência de estrógeno e seus efeitos no reparo ósseo alveolar, foram estudados por Pereira et al. em (2007), através da densitometria óssea e análise histométrica. Foram usadas ratas ovariectomizadas para promover a depleção hormonal, e no 21º dia foi realizada a extração dental. Os resultados obtidos mostraram nos períodos iniciais da cicatrização, um aumento no número de fibroblastos e na concentração de colágeno, e nos períodos tardios uma intensa redução na neoformação óssea.

Almeida et al. em (2007), analisou histomorfometricamente a cicatrização óssea em defeitos provocados no ângulo da mandíbula, em ratos tratados com calcitonina. Os autores observaram que, o volume de matriz óssea neoformada foi significativamente maior no grupo controle do que no tratado, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgicos.

A deficiência de boro na alimentação e sua relação com a cicatrização óssea alveolar em ratos foi analisada por Gorustovich et al. (2008). A análise histométrica mostrou uma redução de 36 e 63% da quantidade de tecido ósseo nos períodos de 7 e 14 dias pós-extração respectivamente.

Quanto as interferências locais no processo de reparo ósseo, Magalhães et al. (1982), afirma que a irregularidade no contorno e altura do alvéolo e a fratura da tábua óssea ou de cristas alveolares durante a exodontia, atrasam a reparação normal.

Para Carvalho e Okamoto (1987), a laceração da gengiva, o diâmetro aumentado do alvéolo, a permanência de fragmentos ósseos sem nutrição, resíduos radiculares e de corpos estranhos no interior do alvéolo, retardam o processo de reparação normal. Além disso, cuidados com a curetagem, irrigação e suturas devem ser tomados, pois estes procedimentos, quando não bem realizados, podem alterar a cicatrização alveolar. Estes autores ainda chamam atenção para as condições periodontais prévias e às infecções, como alveolites, que também são prejudiciais no pós-operatório.

Em 1994, Okamoto et al., avaliaram a importância da permanência do coágulo no interior do alvéolo. No estudo, um grupo de animais teve as bordas do alvéolo suturadas logo após a exodontia, e em outro grupo o coágulo foi removido após 6 a 8 minutos da cirurgia. Houve um profundo atraso na cicatrização no 2º grupo e, embora um novo coágulo tenha sido formado, este não era organizado. Desta forma, concluíram que a qualidade, constituição, manutenção e retração do coágulo são fatores que regulam a formação de tecido conjuntivo durante a reparação alveolar.

Os implantes intra-alveolares, utilizados com a finalidade de coibir hemorragias pós-extração, debelar infecções pós-operatórias, prevenir ou corrigir defeitos ósseos periodontais, manter o contorno do rebordo alveolar ou substituir tecidos perdidos durante procedimentos cirúrgicos, podem provocar reações

inflamatórias persistentes que retardam a reparação ou acontece uma boa aceitação do organismo como está descrito nos trabalhos que se seguem.

Numa revisão realizada por Carvalho e Okamoto (1978), verificou-se que a maioria dos implantes atrasa o processo de reparação. A justificativa empregada é a de que a presença de qualquer material estranho no interior do alvéolo perturbaria a organização do coágulo e provocaria distúrbios na neoformação tecidual, atrasando a cronologia da reparação.

O material pode se comportar como agente irritante, sendo reconhecido como corpo estranho, por isso o organismo tenta eliminá-lo. Isso ocorre também devido à maior irrigação sanguínea das estruturas da cavidade bucal, o que determina maior defesa local e reações mais severas contra corpos estranhos (CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

Apesar disso, numerosos trabalhos foram desenvolvidos com a aplicação (implante/enxerto) local de materiais na busca de um material que promova formação óssea em tempo curto. Estes materiais são chamados de biomateriais, e podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecido e órgãos (WILLIAMS, 1987).

Os implantes de hidroxiapatita, e de fosfato de tricálcico foram testados por Rosa et al. (1994) em estudo histométrico e os resultados mostraram que houve formação de uma menor quantidade de osso durante todos os períodos de estudo. Portanto, neste trabalho, os implantes apesar de biocompatíveis, retardaram o processo de reparação alveolar.

O cimento de ionômero de vidro, material restaurador, foi também avaliado histológica e histometricamente como implante intra-alveolar, em ratos, imediatamente após a exodontia. Brentegani et al. (1996) descreveram que a presença dos grânulos de ionômero de vidro no terço cervical levou a um pequeno atraso na formação óssea apenas na primeira semana. As outras regiões do alvéolo, ao contrário, tiveram uma tendência de apresentar grande quantidade de osso trabecular a partir da terceira semana. Desta forma foi concluído que o material não atrasou o processo de reparação, favorecendo a neoformação óssea. Em outro trabalho realizado pelos mesmos autores em 1997, ficou novamente comprovado que o material, além de biocompatível, foi progressivamente incorporado ao osso.

Lamano-Carvalho et al. (1997b) avaliaram os efeitos do implante imediato de uma resina de poliuretano (*Ricinus communis*) na cronologia da reparação alveolar em ratos. Apesar da biocompatibilidade do material, houve uma alteração no processo de reparação, com atraso na neoformação óssea nos terços médio e apical.

Alves-Rezende e Okamoto (1997) testaram o Tissucol, um material adesivo de fibrina, em alvéolos dentais de ratos submetidos ao estresse. O material foi considerado biocompatível e agiu como um agente hemostático efetivo. Além disso, foi concluído que não houve interferência na formação de tecido conjuntivo e ósseo.

Zerbo et al. (2001) demonstraram que o uso de grânulos de fosfato tricálcico permitiu a formação de novo tecido ósseo em defeitos alveolares. Estes autores sugeriram que o fosfato tricálcico tenha tido ação osteocondutora, isto é, guiando células osteogênicas a partir de um tecido ósseo pré-existente. Além disso, neste mesmo estudo observou-se a formação de osso dentro dos poros das partículas da biocerâmica.

Bombonato-Prado em 2002 avaliou qualitativa e quantitativamente através de microscopia de luz e eletrônica de varredura, os efeitos de uma bebida alcoólica na reparação alveolar, comparando, nesta situação, a ação de uma biocerâmica de fosfato de cálcio (Osteosynt) na neoformação óssea. Teve como conclusão que a utilização da biocerâmica minimiza os efeitos deletérios do alcoolismo crônico sobre a reparação alveolar.

Em 2005, Calixto examinou o comportamento de enxertos ósseos heterógenos orgânico e inorgânico (Matriz Óssea Bovina Liofilizada Orgânica e Inorgânica), de uma mistura de BMPs (Proteínas morfogenéticas do Osso) bovinas e de um vidro bioativo implantados no interior do alvéolo. As observações seguiram até 9 semanas após a exodontia e implantação dos materiais. Em seus resultados concluiu que se deve levar em conta, quando da necessidade da utilização de um biomaterial para preservação /recuperação de um tecido ósseo, que qualquer material introduzido no interior de um defeito pode atrasar a reparação. Portanto, segundo o autor, deve-se ponderar se e em quais circunstâncias um determinado material favoreceria o resultado desejado.

Também, o látex, na forma de grânulos e gel associado ao colágeno, foi avaliado no interior do alvéolo de ratos, em períodos de 7, 21 e 42 dias, por Balabanian (2005). Dos resultados concluiu-se que o látex é um material biologicamente biocompatível, desenvolvendo uma osteointegração progressiva, estimulando a angiogênese e acelerando a neoformação óssea nos primeiros 7 dias da reparação óssea.

Em 2006, Castro avaliou o comportamento do enxerto de composto ósseo de rícino (C.O.R.) em alvéolos dentais e sua eficácia na manutenção do rebordo alveolar em ratos. O C.O.R. é um material aloplástico de origem vegetal derivado do

óleo de mamona, cuja fórmula molecular tem mostrado certa compatibilidade com tecidos vivos e propriedades osteocondutivas. As análises radiográficas e histológicas realizadas pelo autor mostraram que este composto, quando implantado em alvéolos dentais de ratos, é capaz de manter as dimensões do rebordo alveolar, ao passo que nos animais controle as dimensões alveolares não foram mantidas.

Em 2007, Calixto et al., estudaram o enxerto em alvéolos dentais de proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), associadas a um carreador de hidroxiapatita microgranular e colágeno bovino. As BMPs são proteínas consideradas capazes de promover a osteoindução, ou seja, a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, e estes produzirem o tecido ósseo. Nos resultados obtidos pelo grupo de pesquisa, o reparo ósseo alveolar nos ratos implantados e nos ratos controles seguiu o padrão normal descrito na literatura, mas o material utilizado não estimulou a cicatrização óssea em nenhum dos períodos analisados.

Srisubut et al. (2007), analisaram o reparo ósseo em defeitos provocados no ângulo da mandíbula de ratos, usando uma mistura de vidro bioativo e alendronato. O alendronato, um medicamento da classe dos bifosfonados, tem como principal função diminuir a atividade osteoclástica e conseqüentemente a reabsorção óssea, e o vidro bioativo um substituo ósseo com propriedades osteocondutivas. A análise histológica 4 semanas após a cirurgia mostrou que, o grupo experimental tinha significativamente maior quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado ao grupo controle.

Em 2007, Coneglian avaliou em alvéolos dentais de ratos a neoformação óssea após a implantação de sulfato de cálcio di-hidratado e da hidroxiapatita BTCP GenPhos. A análise microscópica qualitativa e quantitativa foi realizada 7, 15 e 30 dias após os procedimentos cirúrgicos. Os resultados mostraram que a evolução do

processo de reparo alveolar nos grupos implantados com biomateriais ocorreu de forma semelhante ao grupo controle (coágulo sanguíneo), destacando-se aos 15 dias, a menor neoformação óssea estatisticamente significativa do grupo tratado com a hidroxiapatita BTCP GenPhos quando comparado ao controle.

Garcia em 2007 avaliou comparativamente, os fenômenos evolutivos do processo de reparo em alvéolos de ratos preenchidos após a extração dental com osso medular bovino inorgânico e hidroxiapatita BTCP densa. Os parâmetros analisados pela autora foram: o infiltrado inflamatório, densidade fibroblástica, densidade angioblástica e neoformação óssea. Os resultados da análise qualitativa e quantitativa mostraram que a hidroxiapatita BTCP densa apresenta características satisfatórias como biomaterial osteocondutor e osteopreenchedor, e quando comparada ao osso bovino inorgânico, os dois materiais obtiveram o mesmo desempenho no processo de reparo alveolar.

Wu; Liu e Zang (2008), analisaram os efeitos da sinvastatina, um medicamento anti-hipercolesterolemia, associado com um carreador de ácido polilático-glicólico (PLGA), implantados em alvéolos dentais de ratos. Os efeitos da associação medicamento-carreador foram estudados histologicamente, através da densidade mineral óssea e de medidas da reabsorção do osso alveolar pós-extração. Os resultados mostram que a altura relativa do rebordo alveolar residual e a densidade mineral óssea foram significativamente maiores no grupo experimental quando comparado aos controles. Histologicamente a associação PLGA-sinvastatina mostrou uma maior quantidade de ilhas de tecido ósseo neoformado quando analisado em 4 semanas pós cirúrgicos, bem como uma melhor qualidade do tecido analisado.

2.2 CAFEÍNA

A cafeína e suas metilxantinas relacionadas são amplamente distribuídas em plantas ao redor do mundo. Toda cultura indígena estável tendo acesso a esses produtos desenvolveram bebidas com estes estimulantes. Portanto, cafeína provavelmente é a substância farmacologicamente ativa mais comumente consumida no mundo, principalmente na Europa e América do norte.

Com fórmula química de 1,3,7- metilxantina, a cafeína está presente em cafés, chás, bebidas carbonatadas, alimentos, medicações para alergias e resfriados, e em suplementos dietéticos (DRISCOLL; JOSEPH-JR; NAKAMOTO, 1990). Segundo Barone e Grice (1994), o consumo diário de cafeína nos USA é de aproximadamente 2,0 mg/Kg .

Relatos demonstram que a cafeína possui uma variedade de respostas celulares e farmacológicas produzindo efeitos biológicos tais como antioxidação, antimutação, angiogênico, ação antibiótica, anti-hipercolesterolemia, anti-hipertensão e antiinflamatória (SUGYIAMA et al., 1999).

Vários trabalhos demonstram que as atividades da cafeína sobre o metabolismo ósseo ainda são controversos (LLOYD et al., 1997).

Driscoll; Joseph-Jr e Nakamoto (1990), avaliaram o efeito da cafeína administrada no pré-natal associada a uma dieta hiperprotéica, no desenvolvimento mandibular de ratos recém-nascidos. Os autores puderam comprovar que houve significativamente, um menor peso mandibular, uma menor concentração de cálcio e uma menor atividade das fosfatases alcalina e ácida, quando comparados o grupo cafeína ao controle, visto que, a atividade da fosfatase alcalina está relacionada com

a calcificação e crescimento do tecido ósseo, e da fosfatase ácida está relacionada à reabsorção.

Em 1991, Tassinari et al. avaliaram *in vitro* os efeitos da cafeína no crescimento de osteoblastos de galinhas e na formação da matriz extracelular. As células foram expostas à cafeína nas concentrações de 0.1, 0.2 e 0.4 mM e análises quanto ao número de células, proliferação celular, atividades da fosfatase alcalina e osteocalcina, níveis de colágeno e cálcio foram realizadas. De acordo com os resultados encontrados os autores concluíram que um dos efeitos da cafeína no desenvolvimento ósseo é o de inibir a mineralização e a formação de uma competente matriz extracelular, bem como a diferenciação osteoblástica.

Os estudos de Barone et al. em 1993 confirmaram *in vivo* os achados do trabalho acima, pois foi observado uma diminuição na mineralização do esqueleto fetal de ratos tratados com cafeína. Segundo os autores estes resultados parecem estar relacionados à inibição da formação óssea endocondral, devido tanto à ação nos estágios iniciais da proliferação de células mesenquimais indiferenciadas em células cartilaginosas bem como em estágios tardios da formação óssea.

Uma extensa revisão de literatura sobre os efeitos da cafeína no cálcio urinário e no metabolismo ósseo foi realizada por Massey e Whiting em 1993. No geral, os autores concluíram que, o potencial de impacto desta droga sobre o osso é devido à sua capacidade em aumentar a excreção de cálcio na urina, e que a suplementação inadequada deste mineral, a fim de manter o equilíbrio eletrolítico, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose.

Sasahara et al. (1994), estudaram a influência da administração crônica de cafeína na estrutura de fêmures de ratos. Concluíram que no grupo tratado com cafeína, a área de tecido ósseo em secção transversal dos fêmures, a concentração

de cálcio, fósforo, zinco, e hidroxiprolina eram menores quando comparados ao grupo controle.

Os efeitos da ingestão de cafeína durante o período neonatal, nas células ósseas e no desenvolvimento ósseo de ratos foram analisados por Wink; Rossowska e Nakamoto (1996). Dos resultados obtidos, observaram-se nos ratos do grupo tratado, fêmures com uma menor quantidade de osteoblastos por área, tíbias apresentando um retardo na remodelação estrutural, e uma diminuição dos níveis plasmáticos de Cu e Zn.

Kamagata-Kiyoura et al. em um estudo realizado em 1999, avaliaram *in vitro*, os efeitos da cafeína associada a prostaglandina E₂ na proliferação de células semelhantes a osteoblastos. Sabe-se que os níveis de PGE₂ se mostram elevados em sítios de inflamação gengival e doença periodontal ativa, levando ao aumento da atividade osteoclástica e conseqüentemente a reabsorção óssea. Neste trabalho a associação cafeína/PGE₂ mostrou uma forte inibição das células semelhantes a osteoblastos, com isso os autores acreditam que possa existir uma relação entre o consumo de cafeína e o agravamento das condições patológicas das doenças periodontais.

Huang et al. (2002), estudaram em ratos, a influência da administração de altas doses de cafeína e da aplicação de exercícios físicos sobre o desenvolvimento ósseo. Concluíram que nos ratos tratados com cafeína houve uma menor densidade mineral óssea e uma menor concentração cálcio, e que os exercícios físicos tiveram um pequeno efeito antagonista aos danos causados pela administração da droga.

Focking; Schmiegelt e Trapp (2005) averiguaram os efeitos da cafeína na atividade dos receptores de glicocorticóides (GR) em células osteoblásticas humanas. Os grandes níveis de glicocorticóides circulantes no organismo e

conseqüentemente a grande atividade dos GRs são capazes de iniciar ou agravar as condições patológicas da osteoporose. Os autores mostraram que a cafeína associada aos glicocorticóides é capaz de aumentar a expressão gênica dos receptores GR em osteoblastos humanos, e deste modo poderia ser um dos mecanismos moleculares do desenvolvimento da osteoporose.

Tsuang et al. (2006), analisaram o papel da cafeína sobre o metabolismo de células osteoblásticas *in vitro*. O comportamento das células foi avaliado através da atividade da fosfatase alcalina, dos níveis de desidrogenase láctica e prostaglandina E₂, e da análise da degradação do DNA. Os resultados mostraram que na dose de 10 mM houve uma diminuição significativa da atividade da fosfatase alcalina, da taxa de desidrogenase láctica e PGE₂ intracelular, e uma alta taxa de formação de fragmentos de DNA. A partir do exposto, os autores concluíram que a cafeína possui um potencial efeito deletério sobre a viabilidade dos osteoblastos, aumentando a taxa de apoptose destas células.

Rapuri; Gallagher e Nawaz (2007) avaliaram os efeitos da cafeína na expressão dos receptores de vitamina D (VDR) e na atividade da fosfatase alcalina (ALP) em osteoblastos humanos *in vitro*. A literatura mostra que a 1,25 Dihidroxi vitamina D₃ quando ligada aos receptores VDR tem um papel fundamental na função de osteoblastos e osteoclastos, e conseqüentemente no metabolismo ósseo. Os resultados mostraram que a cafeína na dose de 1 e 10 mM diminui a expressão dos receptores de 1,25(OH₂)D₃, (VDR), em 50 e 70% respectivamente, e houve diminuição na atividade da fosfatase alcalina da ordem de 50% quando a dose foi de 1 mM.

Dados ainda não publicados de Lacerda e Brentegani, mostraram histomorfometricamente em ratos, que a administração diária de café por um

período prolongado retardou o processo de reparo ósseo em alvéolos dentais nos 3 períodos estudados, 7, 21 e 42 dias. Também os níveis de cálcio no osso mandibular se mostraram diminuídos.

Apesar de muitos trabalhos indicarem efeitos danosos da cafeína sobre o tecido ósseo, alguns estudos indicam o contrário. Glajchen et al. (1988), investigou o efeito da administração crônica de cafeína sobre o metabolismo mineral ósseo em ratos utilizando a histomorfometria e marcadores séricos de mineral ósseo. Os autores mostraram em seus resultados que não houve diferenças quanto à histomorfometria entre os grupos que receberam o tratamento com cafeína e os controles. Em relação aos marcadores apenas a osteocalcina mostrou-se aumentada nos animais que receberam doses maiores da droga.

Lloyd et al. (1997), avaliaram a relação entre o consumo de cafeína e o comportamento do tecido ósseo em mulheres pós menopausa. Os resultados mostraram que nenhuma associação foi encontrada entre o consumo de cafeína e mudanças na massa e na densidade óssea, assim não suportando a idéia de que a cafeína é um fator de risco para perda óssea em mulheres saudáveis pós-menopausa.

Também Conlisk e Galuska (2000), estudaram a associação entre o consumo de cafeína e densidade mineral óssea em mulheres adultas jovens. A média de cafeína ingerida (mg/dia) em dose meses foi calculada com base no consumo diário de diversas substâncias, como café, chás, refrigerantes de cola, produtos de chocolate e medicações. Os autores observaram a partir da densidade mineral óssea da espinha lombar e da cabeça do fêmur, que não há uma associação entre a quantidade de cafeína consumida na dieta de mulheres jovens e a densidade encontrada nessas regiões do osso.

Sakamoto et al. (2001), utilizando ratos machos avaliou a relação entre o consumo de café e o metabolismo ósseo. Os animais foram divididos em 3 grupos: dieta sem café, dieta com café, mas com baixa concentração de cafeína e dieta com café com alta concentração de cafeína. Os resultados mostraram que, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à histomorfometria óssea e quanto a mediadores químicos relacionados com a patogênese da perda óssea como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , entre os grupos.

2.3 OSSO AUTÓGENO

A enxertia de tecido ósseo é um procedimento muito antigo. O primeiro registro do uso deste tipo de enxerto é datado de 1668, quando esta técnica era utilizada a fim de solucionar problemas relacionados à má cicatrização óssea como a não consolidação de fraturas, a consolidação óssea tardia, as pseudo-artroses congênitas, os defeitos ósseos pós-traumatismos, as infecções e os tumores (CHAPMAN; RODRIGO, 2001).

Os enxertos podem ser classificados de acordo com a sua natureza e denominados conforme a terminologia moderna em: enxertos autógenos quando a origem é o próprio indivíduo; alógenos ou homógenos quando originado de indivíduo da mesma espécie, porém com características genéticas diferentes; isógenos quando oriundos de indivíduos geneticamente idênticos; heterógenos ou xenógenos quando advindos de indivíduos de espécies diferentes e aloplásticos quando são de origem sintética (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

A formação de um novo osso pode ocorrer através de três diferentes processos: osteogênese, osteoindução e osteocondução, que são consideradas

como as características ideais de um material de enxerto ósseo (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001).

Osteogênese é definida como nova formação óssea pela existência predominante de células osteoprogenitoras diferenciadas ou osteoblastos presentes dentro do material de enxerto (SUH et al., 2001). Dessa forma um enxerto osteogênico é derivado de tecido ósseo de um local diferente do sítio receptor. Células osteogênicas podem favorecer a formação óssea em tecidos moles ou ativarem rapidamente o crescimento ósseo em sítios com presença do tecido ósseo, ou seja, ocorre a transferência de células viáveis do enxerto para o leito receptor. Assim o osso esponjoso, cuja superfície possui maior área coberta por células, tem um maior potencial de osteogênese quando comparado ao osso cortical (GOLDBERG; STEVENSON, 1987).

Osteoindução tem sido definida como um possível mecanismo de regeneração óssea que envolve formação de novo osso pelas células osteoprogenitoras derivadas das células mesenquimais, sobre a influência das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) isoladas da matriz óssea (WOZNEY, 1995) ou pela própria matriz óssea (URIST, 1965), (URIST; MIKULSKI; LIETZE, 1979).

Osteocondução é o mais conhecido processo de reparação óssea porque os implantes agem como um suporte para o crescimento do osso e é substituído pelo osso novo (DUPOIRIEUX et al., 1994). Este processo não forma, mas sustenta um meio favorável, ou seja, um arcabouço capaz de guiar as células envolvidas no processo de reparo, promovendo a angiogênese e a deposição de novo osso. Estes materiais, entretanto, são incapazes de induzir à formação óssea ectópica como ocorre com os enxertos osteoindutores.

O enxerto de osso autógeno é o procedimento cirúrgico mais comumente utilizado diante da necessidade de reconstrução de defeitos ósseos. Enquanto o emprego de enxertos autógenos mostra vantagens em relação às demais técnicas no que se refere à biocompatibilidade e ao potencial regenerador ósseo (BOYNE, 1999), a experiência clínica e trabalhos experimentais mostram limitações quanto ao ganho efetivo de volume ósseo ao longo do tempo, especialmente com os enxertos “onlay” (SALATA; RASMUSSEN; KAHNBERG, 2002). Tais dificuldades têm levado muitos autores a concentrar seus estudos em fatores que podem influenciar a sobrevivência e a manutenção volumétrica dos enxertos autógenos em longo prazo (ALBERIUS et al., 1996; STEVENSON et al., 1996; GORDH; ALBERIUS, 1998; OZAKI; BUCHMAN, 1998; CARVALHO et al., 2000; PALECKS et al., 2004). Segundo estes estudos a arquitetura interna do enxerto; sua origem embrionária; orientação de aplicação “inlay” ou “onlay”; presença do periósteo no enxerto; tratamento do leito receptor; taxa de revascularização e; métodos de fixação do enxerto no leito receptor parecem participar decisivamente para o sucesso da técnica.

Por muitos anos o osso autógeno de locais intra e extra-orais é considerado a referência “gold standard” como enxerto ósseo (HJØRTING-HANSEN, 2002; MAZOCK; SCHOW; TRIPLETT, 2004; MINICHETTI et al., 2004; JENSEN et al., 2006), devido as suas vantagens biológicas e potencial osteogênico (SANADA et al., 2003), atuando por osteoindução e osteocondução (ELLIES, 1992), promovendo estímulo e aposição de tecido ósseo a partir do osso já existente, atuando como modelo para a neoformação óssea (MANSO; LANG, 1997). Contendo em sua matriz inorgânica, osteócitos, osteoclastos, osteoblastos e proteínas osteogênicas, o osso autógeno apresenta potencial para osteogênese quando usado como enxerto para

melhorar ou corrigir defeitos ósseos (BLOCK; KENT, 1997). O seu uso na reconstrução de defeitos se deve ao fato de não causar reações imunogênicas, por conter células capazes de se diferenciarem em osteoblastos (YOSHIKAWA et al., 2004), capacidade indutora de fatores de crescimento constituída por uma matriz osteocondutiva bioreabsorvível que age como fonte para a angiogênese, infiltração celular, formação de cartilagem e deposição de tecido calcificado (BRUDER; FOX, 1999; MERKS et al., 1999; ORR et al., 2001; KIYOKAWA et al., 2002).

Entretanto a utilização de osso autógeno como material de enxerto causa certo grau de morbidade ao indivíduo, já que é necessário um sítio cirúrgico adicional para a obtenção do enxerto. Além disso, o desconforto pós-operatório do paciente e o risco de infecção do local são aumentados (OREFFO; TRIFFITT, 1999).

A escolha do local doador dependerá da quantidade de volume ósseo necessário para restabelecer o contorno original do processo alveolar reabsorvido. Os possíveis locais para coleta do enxerto envolvem sítios cirúrgicos intra ou extra-orais. As áreas intra-orais mais comumente utilizadas para a remoção do enxerto ósseo são as regiões do mento, margem anterior do ramo da mandíbula e tuberosidade maxilar. As áreas extra-orais utilizadas como doadoras de tecido ósseo englobam a crista ilíaca, a calvária, a tíbia e as costelas (DINATO; POLIDO 2004; GARG, 2004).

Peer (1951) foi o primeiro autor a sugerir que a diferença de histogênese dos enxertos poderia alterar sua incorporação. Observou que os enxertos de ossificação intramembranosa teriam reabsorção menor que os outros. O autor colocava ossos nasais, vômer e parte dos ossos etmoidais oriundos de ressecções de dorso nasal de pacientes, em contato com tecido não ósseo (abdômen). Observou dois anos e meio após, que o osso colocado no abdômen apresentava células ósseas viáveis,

enquanto os enxertos oriundos da costela, da tíbia e da crista ilíaca se reabsorviam totalmente. O autor explicou que, possivelmente, as células dos enxertos corticais de origem embriológica membranosa teriam menor poder de regeneração, porém maior habilidade de reter sua matriz calcificada, apesar do contato com o osso

Vários trabalhos têm mostrado a superioridade dos enxertos de origem intramembranosa, como os da calota craniana, quando comparados aos de origem endocondral, tíbia e crista ilíaca, nas cirurgias reconstrutivas craniomaxilofaciais, (ALONSO, 1992; DONOVAN et al., 1993; OZAKI; BUCHMAN et al., 1998; ITURRIAGA; RUIZ, 2004; CARINCI et al., 2005; SALVATO; AGLIARDI, 2007) pois são pouco reabsorvidos e apresentam maior neoformação óssea, aliados a uma menor morbidade em relação ao procedimento cirúrgico.

Por essas e outras características peculiares ao osso autógeno, várias pesquisas tem sido realizadas a fim de compará-lo aos diversos tipos de materiais substitutos do tecido ósseo.

Em 1975 o osso autógeno foi estudado por Levin et al., que o testaram (osso poroso) em comparação com fosfato tricálcico para tratamentos de defeitos ósseos periodontais em cães. Os resultados indicaram que os defeitos preenchidos com a cerâmica cicatrizaram mais lentamente e que, anquilose e reabsorções da raiz podem ocorrer quando o osso autógeno foi usado

Block e Kent (1985) compararam o uso de hidroxiapatita sozinha com uma combinação com osso autógeno para aumento de rebordo em cães. Foram extraídos os terceiros e quartos pré-molares e os primeiros molares bilateralmente e, em seguida, uma alveolectomia radical foi feita. Depois de 8 semanas os materiais foram colocados nos rebordos em uma nova cirurgia. O osso autógeno foi removido da crista ilíaca dos animais. Ao final de 16 semanas então os autores concluíram

que o uso combinado de hidroxiapatitas e osso autógeno mostraram uma formação de osso em toda a área contribuindo para aumento do rebordo.

Pelos resultados obtidos por Burchardt (1987) os enxertos de osso poroso mostram uma revascularização rápida, mas seu trabeculado é mais facilmente reabsorvido, prejudicando a manutenção da forma e volume do enxerto. Por outro lado, esta reabsorção permite que logo ocorra uma substituição por osso. Já o enxerto de osso compacto persiste por muitos anos e mostra regiões viáveis e necróticas.

Frame et al. (1987) avaliaram o uso de hidroxiapatitas (porosa ou não) sozinhas e em combinação com osso autógeno e gesso paris. Os autores observaram histologicamente, ao final de 24 semanas, que o acréscimo de osso autógeno às hidroxiapatitas não aumentou a deposição de osso. Verificaram ainda que os fragmentos de osso não existiam mais ao final do período.

Em 1989, Wada et al. em seu estudo avaliaram as respostas reparativas em defeitos ósseos em furcas de terceiros e quartos molares em cães, utilizando três materiais: osso autógeno, osso bovino desmineralizado liofilizado e fosfato tricálcico (TCP- β). Os resultados foram obtidos com avaliação histológica depois de 10 semanas. Os autores concluíram que, apesar de todos os materiais terem sido bem aceitos, os defeitos preenchidos com osso autógeno mostraram significativamente uma regeneração mais pronunciada do que a dos outros materiais usados.

De acordo com Citardi e Friedman (1994), dados experimentais de animais demonstram que enxertos de sítios doadores de osso de origem membranosa tendem a sofrer menos reabsorção do que os enxertos de osso de origem endocondral, provavelmente por causa da diferença na arquitetura óssea de cada

um desses tipos de osso. Os autores ressaltam ainda, que a remoção do enxerto do sítio doador está relacionada com a menor morbidade geral.

Nishibori et al. (1994) relataram os resultados de dois casos clínicos de aumento de assoalho de seio, um com osso autógeno da crista ilíaca, e outro com osso bovino desmineralizado liofilizado (DFDB). As amostras dos locais que receberam osso autógeno foram obtidas depois de 8 meses da cirurgia, e dos locais onde foram usados o DFDB após 16 meses. As observações sugeriram que o osso autógeno produz osso em quantidade e qualidade adequada para os locais de implantes, enquanto que o enxerto com DFDB não fica completamente remodelado pelo osso do hospedeiro e produz osso em quantidade e qualidade insuficiente para os locais de implantes.

Um trabalho feito por Triplett e Schow (1996), descrevendo técnicas para aumentar contorno e altura de processo alveolar em desdentados, analisou o uso de enxerto de osso autógeno para colocação simultânea ou secundária de implantes osteointegrados. Os enxertos foram obtidos da crista ilíaca e da mandíbula. Com as observações os autores concluíram que os enxertos de osso autógeno podem ser usados com segurança para promover habilidade na colocação de implantes. O sucesso dos implantes nos locais com osso autógeno foi melhor quando os implantes foram colocados secundariamente, 6 a 9 meses depois dos enxertos. A falha dos implantes não implicou em falha dos enxertos ósseos, e em todos os momentos onde os implantes falharam na osteointegração, enxertos ósseos foram suficientes para permitir implantes subseqüentes.

Becker et al. (1998) se propuseram em comparar a reparação alveolar em 8 pacientes após a implantação de osso bovino, osso bovino desmineralizado liofilizado (DFDBA), osso autógeno ou proteínas morfogenéticas de osso humano

em um veículo de osteocalceína/osteonectina (hBMP/NCP). As biópsias foram feitas após 3 a 6 meses depois do tratamento para análise histológica. Os resultados deste estudo indicaram que os alvéolos que receberam hBMP/NCP, continham um osso lamelar com trabeculado bem vivo. Os demais materiais utilizados promoveram reparação alveolar, e aparentemente não interferiram no processo.

Sabendo que os enxertos de osso autógeno podem ser de osso poroso ou compacto, Merx et al. (1999a) compararam a resposta destes dois tipos com osso bovino mineral reabsorvível (RBM) em defeitos ósseos em seios maxilares de cabras. Com a avaliação histológica, após 24 semanas, foi concluído que os dois tipos de osso foram aceitos e incorporados da mesma maneira nos defeitos ósseos. Já em relação ao RBM, a conclusão foi que este material foi somente osteocondutivo.

Um estudo em cães feito por Hockers et al. (1999), testou o efeito de uma membrana reabsorvível suportada por enxertos xenógenos ou autógenos na reparação óssea dentro de defeitos ósseos ao redor de implantes. Foram extraídos os terceiros e quartos pré-molares e os primeiros molares mandibulares bilateralmente. Depois de 4 meses, 3 defeitos ósseos foram criados de cada lado da mandíbula, e foram colocados 1 implante por defeito. Os 6 locais foram distribuídos em 4 grupos, sendo um controle, sem membrana ou enxerto. Os outros receberam somente membrana, membrana com osso bovino desproteínizado, e o último, membrana com osso autógeno retirado no momento de confecção do defeito. Depois de 16 semanas, os resultados mostraram que a membrana reabsorvível promoveu maior formação óssea quando em conjunto com os enxertos. Os autores concluíram ainda que não houve acréscimo na formação óssea com a utilização de osso autógeno, quando comparado com o uso de osso bovino.

Orsini et al. (2001), testaram e compararam o uso de duas combinações de materiais para tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais: osso autógeno com sulfato de cálcio e osso autógeno com membrana reabsorvível. Os autores observaram a profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento durante a sondagem durante 6 meses. Concluíram que as duas terapias foram compatíveis nos resultados.

Donos et al. (2002) também avaliaram a utilização de membranas em combinação com osso cortical autógeno, mas neste trabalho foram usadas membranas não reabsorvíveis. A intenção do uso destes materiais foi conseguir um aumento do rebordo em ratos. Os autores fizeram análise histológica em material conseguido 15, 30, 60 e 90 dias após a cirurgia. Dos resultados concluiu-se que o volume do enxerto de osso autógeno pode ser mantido com a cobertura de uma membrana, quando esta estiver apropriadamente adaptada e coberta com mucosa durante a cicatrização. Nos animais onde isto não ocorreu, osso autógeno implantado apresentou reabsorções e falta de continuidade entre o enxerto e osso do sítio receptor.

Já Tadjoeidin et al., (2002), comparam o osso autógeno com um vidro bioativo (BG) em relação a capacidade destes em promover aumento do osso maxilar no assoalho do seio em humanos. Estes materiais foram testados em 3 pacientes nos dois lados da maxila. De um lado foi colocada uma mistura de 80-100% de BG com 20-0% de partículas de osso da crista ilíaca. Do outro lado 100% de osso autógeno foi utilizado como enxerto. As biópsias foram feitas depois de 4, 6 e 15 meses após as cirurgias. Os resultados sugeriram que uma mistura com 80-90% de BG com 10-20% de osso autógeno são efetivos na reparação óssea para aumento do assoalho

de seio, necessitando de 6 meses para cicatrização, enquanto que 12 meses são necessários para cicatrização com osso autógeno somente.

Kiyokawa, Tanaka e Inoue (2002), avaliaram a habilidade de pacientes com periodontite avançada em recuperar a função mastigatória, usando seus próprios dentes e enxertos com osso poroso da crista ilíaca para regeneração de osso alveolar. 65 dentes foram reimplantados juntamente com os enxertos de osso autógeno. Após 2 anos e 8 meses de observação, somente 4 dentes tiveram insucesso. Os autores verificaram radiograficamente, a formação de osso alveolar e, mesmo no final das observações, nenhuma reabsorção do osso neoformado ou radicular foi encontrada.

Em um trabalho realizado por Cochran et al. (2003) uma associação de osso autógeno e emdogain foi usada em defeitos ósseos de 1 a 6 mm criados ao lado de dentes na mandíbula de macacos. Os autores observaram, depois de 2 meses, a formação óssea e a de cimento. Concluíram que a associação dos materiais produziu maior quantidade de formação dos dois tecidos analisados, quando comparada com a utilização somente de emdogain. Vale ressaltar ainda que estes resultados foram melhores nos defeitos menores.

Em 2004, Wiltfang et al. analisou os efeitos da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) com o osso autógeno e com outros biomateriais em defeitos críticos na calvária de miniporcos. Os defeitos foram preenchidos com osso autógeno, cerâmica de fosfato-tricálcio degradável (CeraSorb), matriz óssea bovina (Bio-Oss) e colágeno bovino (Colloss) associados ou não ao PRP, e os animais foram sacrificados depois de 2, 4 e 12 semanas. Os autores observaram que o PRP foi capaz de promover aumento na cicatrização óssea apenas quando associado ao

osso autógeno e não aos outros biomateriais, e que sua ação se dá apenas nos estágios iniciais da reparação óssea.

Segundo Khan et al. (2005) a incorporação do enxerto de osso autógeno na área receptora depende de vários fatores, como: tipo de enxerto (vascular ou avascular), local do sítio doador, qualidade do osso transplantado e do osso receptor, preparação da área receptora, doenças locais e sistêmicas e propriedades mecânicas do enxerto.

Um estudo feito em 2005 por Kim et al., comparou o uso de osso autógeno e um biomaterial reabsorvível a base de carbonato de cálcio em defeitos intra-ósseos periodontais em cães. O objetivo foi avaliar histologicamente, após 8 semanas das cirurgias, a reparação dos tecidos periodontais, com foco em reabsorções radiculares e anquilose, após a implantação dos materiais. Concluíram que ambos não promovem reabsorções ou anquilose, mas que, apesar disso, o potencial osteogênico do osso autógeno é limitado.

Silva et al. (2005) estudando a reparação de defeitos ósseos em ratos usaram a hidroxiapatita em forma de discos porosos, em comparação ao osso autógeno. Os resultados histológicos e radiográficos depois de 2, 4, 8 e 24 semanas após a cirurgia mostraram que, ao final das 24 semanas, os defeitos preenchidos com osso autógeno ou com a biocerâmica mostraram volumes similares de tecido ósseo neoformado.

Besenlechner et al. (2005), estudaram o potencial de membranas de reabsorção lenta (PTLM), em combinação com enxertos de osso autógeno e osso bovino desproteinizado (DBBM), na reparação óssea com finalidade de aumentar o rebordo alveolar em macacos. Cavidades foram preparadas na mandíbula 3 meses depois da extração dos primeiros e segundos molares. Os defeitos ósseos

receberam o osso autógeno somente (ABB), ABB+PTLM e DBBM+PTLM. Depois de nove meses, os resultados mostraram que os locais desprotegidos com a membrana ocorreram reabsorções. Portanto, tanto ABB quanto DBBM foram efetivos para aumento de rebordos, em defeitos deste tipo, nos locais onde estavam protegidos pela membrana.

Jardini, De Marco e Lima (2005) analisaram histomorfometricamente o comportamento do enxerto de osso autógeno coberto ou não por membrana de e-PTFE. O bloco ósseo para enxerto foi retirado da calvária e fixado na cortical do ângulo da mandíbula em ratos, e os mesmos foram cobertos ou não pela membrana. Os resultados mostraram que no grupo onde não foi usada a membrana houve perda óssea da ordem de 24% durante o processo de cicatrização, e que o volume inicial do enxerto diminuiu com o passar do tempo. Em contraste, no grupo onde foi usada a membrana houve um ganho de tecido ósseo de aproximadamente 55%, mostrando que o volume total de osso neoformado foi maior que o enxerto no período inicial.

Zijderveld et al. (2005) estudou em humanos o uso do osso autógeno comparado ao fosfato tricálcio $-\beta$ em cirurgias de levantamento de seio maxilar. Os autores concluíram que o enxerto de osso autógeno ainda é o padrão ouro na substituição e reconstrução óssea, mas que o uso limitado do fosfato tricálcio- β mostrou ser um procedimento clinicamente seguro nestas cirurgias.

Silva e Camilli (2006) estudaram o uso do osso autógeno associado ao laser de baixa potência em defeitos na calvária de ratos. Os estudos mostraram que o uso combinado de osso autógeno com a laserterapia estimulou a osteogênese durante os períodos iniciais do processo cicatricial e que a magnitude do reparo ósseo foi dependente da dose irradiada.

O osso autógeno foi comparado através de análise histológica e histomorfométrica, a 2 materiais usados em cirurgias ortopédicas e orais, por Jensen et al. (2006). Três defeitos ósseos foram realizados no ângulo mandibular de miniporcos e preenchidos com osso autógeno, osso bovino inorgânico e fosfato tricálcio- β . Os autores observaram que em 2 semanas, osso autógeno apresentou maior neoformação óssea quando comparados aos outros 2 biomateriais, em 8 semanas não se encontrou diferenças no percentual ósseo comparado ao fosfato tricálcio- β , mas um menor valor foi observado nos defeitos preenchidos com osso bovino inorgânico. Do exposto concluem que, o osso bovino inorgânico e o fosfato tricálcio- β desaceleram a regeneração óssea nas fases iniciais do reparo, quando comparados ao osso autógeno, mas apresentam boa integração ao osso, e foram capazes de promover a cicatrização do mesmo.

Silva et al. (2007), analisaram em ratos o reparo de defeitos ósseos no crânio com o uso de enxerto ósseo autógeno e cerâmica de fosfato de cálcio. Três defeitos foram produzidos na calvária e preenchidos com osso autógeno, cerâmica de fosfato de cálcio e apenas o coágulo sanguíneo, em seguida os animais foram sacrificados em 1, 2, 4 e 24 semanas após a cirurgia para análise radiográfica e em microscópio de luz. Dos resultados os autores puderam concluir que a cerâmica de fosfato de cálcio usada neste experimento foi tão efetiva quanto o osso autógeno em reparar estes tipos de defeitos, mas que o uso das mesmas clinicamente deve ser cauteloso, pois as cerâmicas podem apresentar baixa resistência mecânica.

Em 2007 um estudo realizado no nosso laboratório, Prata et al. avaliaram histológico e histometricamente, o comportamento do reparo ósseo alveolar, utilizando como material de enxerto intra-alveolar osso autógeno e proteínas derivadas da matriz do esmalte. Os pesquisadores puderam concluir em seus

resultados que os fragmentos de osso autógeno desenvolveram progressiva osteointegração e não sofreram reação de corpo estranho. Também comprovaram que a fração de volume de osso trabecular adjacente ao enxerto, foi de 10 a 15% maior no grupo que recebeu osso autógeno associado a proteínas derivadas da matriz do esmalte do que no grupo que recebeu apenas o osso autógeno.

Neste mesmo ano (2007), Melo investigou a influência do osso autógeno particulado retirado da crista ilíaca no processo de reparo ósseo alveolar em ratos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e mostraram que houve um aumento progressivo da densidade de área ocupada por osso em função dos tempos pós-operatórios e a morfometria da densidade da área ocupada por osso nos grupos controle e experimental não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos tempos pós-operatórios. Assim o autor conclui que o osso autógeno não promoveu um aumento estatisticamente significativo na neoformação óssea em alvéolos dentais de ratos nos períodos estudados.

Da Silva et al. (2008) comparou a integração de enxerto de osso autógeno e matriz óssea bovina desvitalizada na reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratos tratados com diversos antiinflamatórios. A avaliação histológica constou da quantificação do processo inflamatório, osso neoformado, macrófagos e formação de colágeno. Os resultados mostraram maior reação inflamatória e maior número de macrófagos nos animais cujos defeitos ósseos foram preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada quando comparados aos preenchidos com osso autógeno. Dos antiinflamatórios utilizados, o diclofenaco de sódio e o meloxicam retardaram a reparação dos enxertos ósseos, ao passo que a dexametasona teve resultados similares ao grupo controle.

A capacidade de integração e reparação óssea dos enxertos de osso autógeno em ratas com deficiência estrogênica foi estudada por Luize et al. (2008). Após um período de 30 dias da castração dos animais, um enxerto ósseo autógeno tendo como área doadora a calota craniana foi retirado e fixado ao ângulo mandibular. Os animais foram sacrificados em 7, 14 e 28 dias após o procedimento de enxertia para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que em 28 dias o enxerto do grupo controle estava aparentemente integrado à mandíbula, enquanto no grupo de ratas castradas a interface enxerto-sítio receptor estava parcialmente preenchida por tecido ósseo neoformado com áreas de tecido conjuntivo interposicional, revelando uma taxa de neoformação óssea de 57,41% contra 40,82% respectivamente. Concluíram os autores que a depleção estrogênica retardou o processo de reparo ósseo dos enxertos autógenos em mandíbulas de ratas.

2.4 CÉLULAS TRONCO

2.4.1 Conceitos, Origens, Definições e Propriedades

Os diferentes órgãos dos seres vivos mais evoluídos (eucariotos) são formados por tecidos diferenciados que exercem atividades especializadas. Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo, após a fecundação de um óvulo por um espermatozóide. Essa única célula tem, pois, a propriedade de formar todos os tecidos do indivíduo adulto. Inicialmente, essa célula totipotente divide-se formando células idênticas, mas, muito precocemente na formação do embrião, os diferentes

grupos celulares vão adquirindo características especializadas e, ao mesmo tempo, vão restringindo sua capacidade de diferenciação). No entanto, na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo esta própria reserva de células indiferenciadas. Essas células tronco tecido-específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. Essas células progenitoras capazes de diferenciar-se em tecidos adultos especializados são denominadas células tronco. As células tronco são um tipo de células indiferenciadas, sem função específica nos tecidos, capazes de multiplicar-se mantendo-se indiferenciadas por longos períodos (tanto *in vitro* como *in vivo*), mas que diante de estímulos específicos podem diferenciar-se em células maduras e funcionais dos tecidos, ou seja são capazes de se auto-renovarem e dar origem a células especializadas. (ZAGO; COVAS, 2006).

Estas células são quiescentes, i.e. se mantêm por longo período de tempo na fase G_0 do ciclo celular, e possuem duas propriedades fundamentais: são capazes de se auto-renovarem e de realizar divisões celulares assimétricas. Em essência as células tronco quando ativadas por algum sinal ou evento podem deixar seu estado de repouso e avançar no ciclo celular, dando origem a 2 tipos celulares diferentes, o que é conhecido como divisão celular assimétrica. Um tipo celular mantém as características da célula-mãe permanecendo indiferenciadas, repondo o *pool* de células tronco local, propriedade esta conhecida como auto-renovação. O outro tipo celular se prolifera por divisão simétrica dando origem as células progenitoras, que têm a capacidade de se diferenciarem em células especializadas, como

osteoblastos, formando tecidos maduros (MUSCHLER; MIDURA, 2003; ZAGO; COVAS, 2006).

A auto-renovação desempenha um importante papel, pois se todas as células tronco se tornassem células diferenciadas, a população das mesmas diminuiria progressivamente a partir de cada evento de ativação, o que levaria ao rápido esgotamento da população destas células em todos os tecidos normais, resultando em um número insuficiente para suportar os processos de remodelação e reparo necessários para a manutenção em longo prazo da saúde do organismo (LIN, 1998).

As células tronco e as células progenitoras estão presentes em praticamente todos os tecidos humanos normais e são fundamentais para sua saúde, manutenção e resposta a lesões ou doenças durante a vida. De acordo com Bianco et al. (2001), estas células são a fonte de todos os tecidos novos formados pelos sistemas de reparo e remodelação e são moduladas por sinais químicos e físicos que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência.

Quanto à origem as células tronco podem ser classificadas em: embrionárias e adultas.

Nos períodos iniciais após a fecundação (4^o ou 5^o dia) o “embrião” (neste momento chamado blastocisto) contém uma camada externa e uma massa celular interna. As células da massa interna vão dar origem ao feto e a parte dos tecidos extrafetais (âmnio e alantóide), ao passo que a camada externa de células (trofoectoderma) vai originar alguns tecidos restritos à placenta. Estas células da massa celular interna podem ser retiradas e cultivadas, dando origem a linhagens de células tronco embrionárias, que têm capacidade de se diferenciarem nos diversos tecidos do adulto. A célula tronco adulta ou somática é um tipo de célula obtida de tecidos após a fase embrionária (feto, recém-nascido, adulto). Até agora, estas

células isoladas em humanos são tecido-específicas, ou seja, têm capacidade de diferenciação limitada a um único tipo de tecido ou a alguns poucos tecidos relacionados. Hoje está bem demonstrado que numerosos tecidos humanos (ou talvez todos) têm células tronco, que constituem uma reserva da qual o organismo lança mão para repor células maduras desgastadas ou quando ocorre lesão ou remodelação dos tecidos. Assim são bem conhecidas as células tronco de pele, da mucosa intestinal, do epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões, músculo esquelético, músculo cardíaco, sangue de placenta e de cordão umbilical, medula óssea e sangue periférico (ZAGO; COVAS, 2006).

Quanto à capacidade de diferenciação, as células tronco podem ser classificadas em: - Totipotentes, quando têm a capacidade de se diferenciarem em todos os tecidos do corpo humano, incluindo anexos embrionários; Pluripotentes, quando são capazes de se diferenciarem em todos os tecidos do corpo humano, exceto placenta e anexos embrionários; Oligopotentes, quando se diferenciam em apenas alguns tecidos do corpo humano; e Unipotentes, quando se diferenciam em apenas um único tipo celular (ZAGO; COVAS, 2006).

2.4.2 Medula óssea e células tronco

A medula óssea é o sítio doador mais usado clinicamente para a obtenção de células tronco. Ela pode ser caracterizada como um órgão composto por dois sistemas principais que originam linhagens celulares distintas: o sistema hematopoiético propriamente dito e o seu estroma de suporte (BIANCO, 2001).

Segundo Owen (1985), as evidências de que existe no estroma um sistema de células tronco capaz de originar diversas linhagens e fenótipos celulares fazem

da medula óssea o único órgão conhecido onde dois sistemas distintos de células tronco e tecido interligados não só coexistam, mas também cooperem funcionalmente. Assim, foram definidos dois grupos de células tronco na medula óssea: células tronco hematopoiéticas, que dão origem as células sanguíneas e às do sistema imune, e as células tronco do estroma (mesenquimais), que podem formar osso, cartilagem, gordura e tecido muscular.

As células tronco mesenquimais foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein et al. em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F = *colony forming units – fibroblastic*). Neste estudo observou-se que transplantes heterotópicos de medula óssea eram capazes de formar osso novo a partir de células proliferativas que persistiam mesmo após a morte das células hematopoiéticas.

Em 1968, Friedenstein et al. na tentativa de conhecer as células que levaram a formação de osso novo, desenvolveram uma cultura de células mesenquimais do estroma da medula óssea e posteriormente transplantaram estas células para a cápsula renal e para o tecido subcutâneo de animais de experimentação. Tanto na cápsula renal quanto no subcutâneo houve a formação de um tecido osteogênico constituído por tecido cartilaginoso e ósseo.

As células tronco mesenquimais (CTM) constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (PITTENGER et al., 1999). Entretanto, podem ser isoladas e expandidas com alta frequência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas.

As CTM são facilmente isoladas de aspirados da medula óssea obtidos da crista ilíaca superior, da tíbia, do fêmur e da coluna vertebral lombar e torácica de humanos e de grandes mamíferos. (DIGIROLAMO et al., 1999; MURPHY et al., 2003). A partir de todas estas fontes, o procedimento de isolamento e cultura das CTM é muito semelhante, envolvendo uma fase inicial de separação das células mononucleares em gradiente de densidade, seguida do plaqueamento e incubação com meio essencial mínimo suplementado com 10% a 20% de soro bovino fetal. O potencial de expansão *in vitro* das CTM é variável, algumas preparações crescem por mais de 20 ciclos de duplicação celular sem sinais de senescência e outras não suportando mais do que a quatro ciclos. (BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1997; DIGIROLAMO et al., 1999).

A diferenciação osteogênica das CTM requer a presença de indutores que incluem betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias as células mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio (ZAGO; COVAS, 2006).

2.4.3 Células tronco e a reparação óssea.

No restabelecimento da função de qualquer tecido lesado, é necessária a proliferação celular e a produção de nova matriz, a fim de promover a união dos segmentos teciduais saudáveis. As células que participam do processo reparador costumam estar totalmente diferenciadas e presentes no local, porém, com relação à cicatrização óssea, muitas vezes o restabelecimento da arquitetura de grades defeitos ultrapassa a capacidade funcional dos osteoblastos existentes no sítio a ser

reparado. Portanto, como os osteoblastos participam em uma extensão limitada, a presença de células tronco osteoprogenitoras provedoras de novos osteoblastos é determinante para o sucesso do processo cicatricial ósseo. A falência na mobilização, proliferação e diferenciação destas células levam a um atraso ou até mesmo a não formação de um novo tecido ósseo (YOO; JOHNSTONE, 1998).

Segundo Muschler e Midura (2002), o objetivo do transplante de células tronco mesenquimais é compensar a deficiência no número e/ou atividade das células reparadoras no local interessado, que pode ocorrer por traumatismos prévios, infecção, irradiação ou deficiência vascular. Este procedimento pode melhorar o desempenho dos enxertos osteocondutivos e osteoindutores, mesmo nos locais envolvidos por tecidos saudáveis. Deste modo, mesmo o processo cicatricial de tecidos normais pode ser prejudicado pela baixa concentração das células tronco mesenquimais (MUSCHLER et al., 2003).

Muitos trabalhos comprovam a importância do fornecimento adicional de células tronco em locais com formação óssea prejudicada, sendo a medula óssea o sítio mais comumente usado na obtenção destas células.

Burwell (1961) foi o primeiro a notar que o uso das células da medula óssea autógena promovia bom resultado na integração de enxertos ósseos não autógenos. Desde então, muitos estudos vêm sendo realizados a fim de melhorar a osteogênese em aloenxertos ou xenoenxertos ósseos (WIENTROUB et al., 1989).

Salama e Wiessman (1978) descreveram uma série clínica, onde pacientes submetidos à ressecção de tumores ósseos benignos, à correção de perdas ósseas pós-traumatismos, a artrodeses e a correção de pseudoartroses foram tratados com a utilização de osso bovino liofilizado associado à medula óssea autógena. Os resultados mostraram que dos 31 pacientes operados, houve sucesso em todos. Os

autores concluem que o xenoenxerto por eles utilizado, embora sem células viáveis, serviu apenas como molde (scaffold) para as células vivas presentes na medula óssea.

A aplicação de aspirados de medula óssea autógena em artrodeses de processo espinhoso de coelhos foi estudada por Lindholm et al. (1982, 1988). Os resultados mostraram que quando comparada ao osso autógeno e a matriz óssea isoladamente a combinação da matriz óssea desmineralizada com o aspirado de células da medula óssea resultou em uma fusão vertebral mais rápida e estável.

Paley (1988) avaliou a eficácia da medula óssea na formação de calo ósseo em osteotomias na ulna de coelhos. Os autores observaram que, no grupo onde foi administrado percutaneamente o aspirado de medula óssea, houve a formação mais rápida do calo ósseo e este era de melhor qualidade que nos animais do grupo controle.

No ano de 1991, Grundel et al. associaram o aspirado de medula óssea com fosfato de cálcio bifásico cerâmico. A análise feita pelos autores mostrou a união completa de falhas ósseas na ulna de cães após a administração local dessa associação.

Utilizando cilindros porosos de hidroxiapatita/fosfato-tricálcio associados a células tronco osteoprogenitoras derivadas da medula óssea, Kadyiala et al. (1997) observaram regeneração óssea completa em um defeito ósseo segmentar no fêmur de ratos

Krzymansky et al. (1997) analisaram os efeitos da aplicação de células de aspecto fibroblastóide derivadas da medula óssea e de medula óssea fresca na reparação de defeitos ósseos em ângulo mandibular de coelhos. As células da medula óssea foram cultivadas em laboratório previamente à cirurgia, e juntamente

com a medula óssea autóloga fresca foram comparadas ao osso autógeno e ao osso alógeno, por meio de análise histológica e radiográfica. Os autores observaram que os melhores resultados foram obtidos na associação das células da medula óssea expandidas *in vitro* associadas à medula óssea fresca, e no uso da medula óssea fresca isoladamente. Quando as células expandidas *in vitro* foram utilizadas isoladamente, a reparação óssea foi ligeiramente menor que a do osso autógeno, mas superior ao osso alógeno. Concluem a partir do exposto que a medula óssea é uma boa fonte de células osteogênicas tanto para o transplante imediato quanto para a expansão *in vitro* e subsequente uso.

Bruder et al. em 1998, analisaram o efeito das células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea associadas a uma biocerâmica na cicatrização de defeitos ósseos segmentares em fêmures de cães. As células mesenquimais da medula óssea autóloga foram cultivadas em laboratório e uma biocerâmica composta por hidroxiapatita e fosfato-tricálcio β foi usada como carreador destas células na reconstrução do defeito ósseo. Os resultados mostraram nos animais que receberam a biocerâmica contendo as células uma rápida união na interface osso/biomaterial formando um exuberante calo ósseo, nos animais que receberam apenas a biocerâmica houve união dos segmentos ósseos, mas sem a formação do calo ósseo, ao passo que animais sem tratamento não houve união dos segmentos ósseos. Os autores concluem que esta terapia celular poderia ser uma alternativa ao uso do osso autógeno na reparação de amplos defeitos ósseos.

Em 2003, De Kok et al. comparam o uso de células tronco mesenquimais autógenas e alógenas na formação óssea alveolar em cães. Matrizes de hidroxiapatita/fosfato-tricálcio foram utilizadas como carreador das células tronco mesenquimais autógenas e alógenas expandidas em laboratório, para a implantação

em um defeito ósseo na mandíbula de cães. Os resultados histométricos mostraram quantidades equivalentes de osso neoformado no interior dos poros tanto das matrizes que continha as células tronco mesenquimais autógenas quanto nas alógenas, em compensação nas matrizes sem a presença das células a neoformação óssea foi menos extensa. Quanto à resposta imunológica, não houve histologicamente, atividade tanto para as células autólogas quanto para as alógenas, e a análise dos níveis de anticorpos circulantes não mostrou resposta imune sistêmica ao hospedeiro em nenhum dos dois tipos celulares. Os autores concluem que as células tronco mesenquimais autólogas e alógenas possuem a capacidade de regeneração óssea em defeitos craniofaciais.

Yamada et al. (2004) analisaram em cães, o uso das células tronco mesenquimais (MSC) em associação com o plasma rico em plaquetas (PRP) em defeitos ósseos mandibulares. A associação foi comparada ao osso autógeno, que é considerado o padrão ouro em enxertos ósseos, ao PRP isoladamente e ao não tratamento, ou seja, sem o uso de biomaterial. Histometricamente foi mostrado que o grupo MSC/PRP obteve uma neoformação óssea da ordem de 67,3%, comparado ao osso autógeno (61,4%), ao PRP (29,2%) e ao controle (18,3%). Concluíram neste estudo que, a associação dos biomateriais estudados possui adequada capacidade osteogênica.

A reconstrução de defeitos na região maxilofacial através do uso de osso alógeno de crista ilíaca associado a osteoblastos derivados da medula óssea foi estudada por Li e Li em 2005. Defeitos no ângulo mandibular foram reconstruídos com o osso alógeno somente e associado aos osteoblastos. As observações radiográficas e histológicas revelaram que o uso das células promoveu a neoformação óssea na margem do defeito e atividade osteogênica no centro, o que

não foi observado no outro grupo. Segundo os autores, este tipo de enxerto promoveu a formação óssea pelas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutivas.

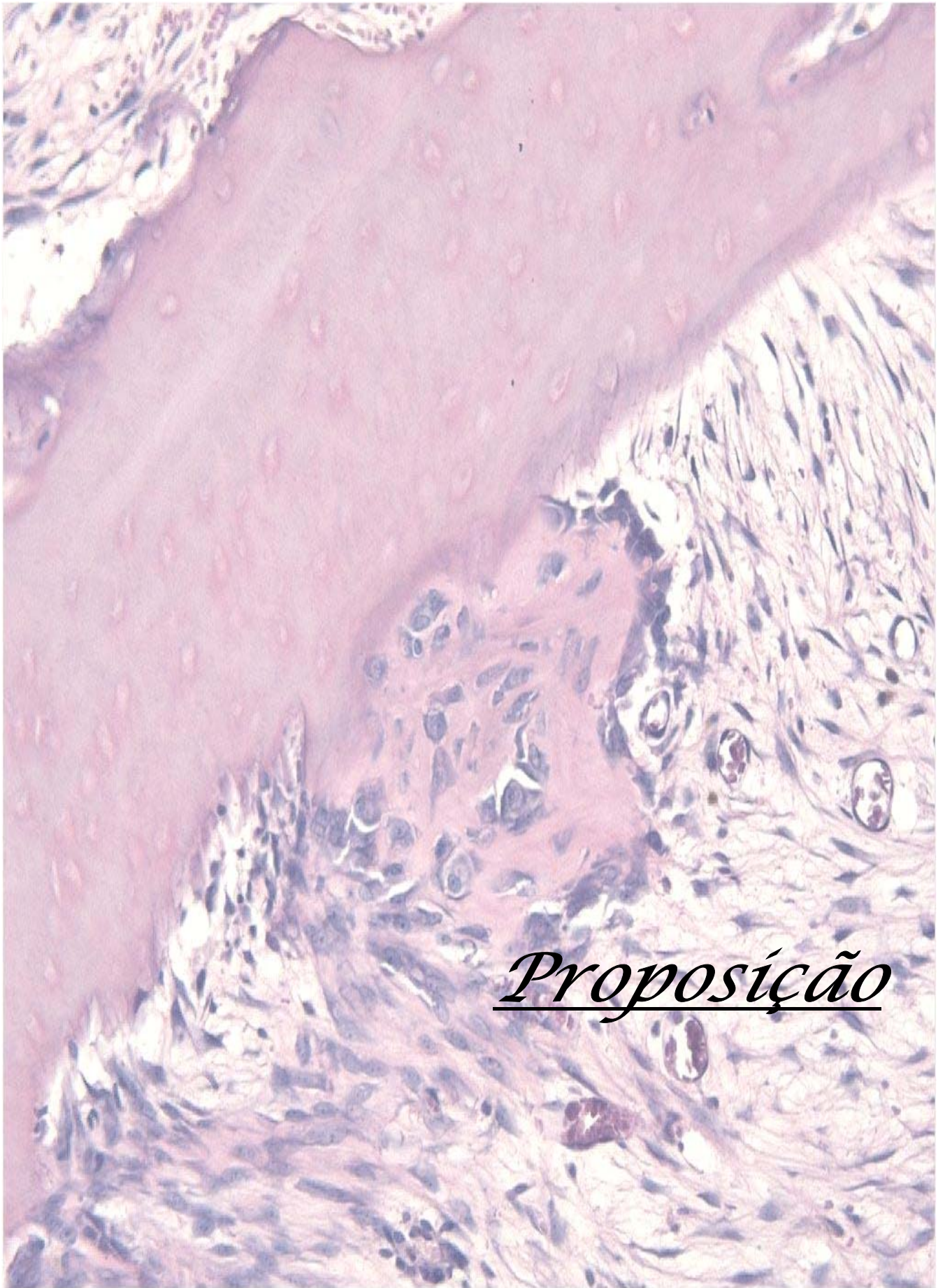
Marei et al. (2005) estudaram os efeitos das células tronco mesenquimais na preservação e regeneração do osso alveolar após extração dentária em coelhos. As células tronco mesenquimais foram expandidas em laboratório e pré-cultivadas em um molde de ácido poli-lático/poliglicólico (PLGA) para a implantação no alvéolo dental após a extração. Os animais foram divididos em 3 grupos: os que não receberam tratamento, os que foram realizados a implantação apenas do PLGA isoladamente e os que receberam o PLGA associado às células tronco. A análise histológica e radiográfica mostraram após 4 semanas uma manutenção das paredes ósseas alveolares e uma maior densidade de tecido ósseo no grupo PLGA/células tronco, o que não foi observado nos outros dois grupos. Os autores concluem que esta associação se mostra promissora na cirurgia dentoalveolar, ainda que estudos longitudinais levando em consideração as diversas variáveis clínicas devam ser realizados.

O uso da engenharia tecidual óssea utilizando células tronco mesenquimais (MSC), cola de fibrina e plasma rico em plaquetas (PRP) na regeneração óssea ao redor de implantes dentários foi avaliada em cães por Ito et al. (2006). Após a instalação dos implantes na mandíbula dos cães, os defeitos ósseos perimplantares foram tratados com apenas com fibrina (I), MSC e fibrina (II); MSC, fibrina e PRP (III) e permaneceu sem tratamento (IV). A análise histológica e histomorfométrica após 8 semanas mostraram uma maior superfície de contato implante/osso da ordem de 53% no grupo III quando comparado aos grupos IV (29%), I (25%) e II (42%). Assim, neste estudo conclui-se que o uso da associação destes materiais pode ser uma alternativa previsível na regeneração óssea simultânea à colocação de implantes.

Neste mesmo ano (2006), Hibi et al. utilizaram clinicamente a associação de células tronco mesenquimais associadas ao plasma rico em plaquetas na reconstrução de uma fenda alveolar. Através de punções na crista ilíaca anterior do paciente a medula óssea foi obtida, em laboratório foi realizado o cultivo e diferenciação em células tronco mesenquimais osteoprogenitoras, seguido pela inserção cirúrgica das mesmas associadas ao PRP. Os autores observaram que após nove meses 79,1% da área enxertada possuía formação óssea adequada.

Vaz em 2006 mostrou que o centrifugado osteogênico de medula óssea favoreceu a consolidação de osteotomias experimentais em fíbulas de coelho, e promoveu uma melhora na qualidade do calo ósseo.

Jafarian et al. (2008) avaliaram a capacidade de regeneração óssea comparando dois tipos de carreadores para células tronco mesenquimais em defeitos na mandíbula de cães. Os carreadores analisados foram a hidroxiapatita/fosfato-tricálcio β (HA/TCP) e o Bio-Oss esponjoso, que é um osso mineral bovino. Os dois materiais foram implantados no músculo masseter e em defeitos no ângulo mandibular de cães, cada biomaterial associado ou não às células tronco mesenquimais osteoprogenitoras obtidas da medula óssea dos animais. A análise histomorfométrica mostrou maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos grupos que receberam as células osteoprogenitoras, nos defeitos ósseos os grupos H/TCP e HA/TCP + células obtiveram taxas de 65,78% e 44,9% respectivamente, e nos grupos Bio-Oss e Bio-Oss + células os valores foram de 50,31% e 36,84%. Portanto os substitutos ósseos sintéticos bifásicos associados às células tronco mesenquimais podem oferecer melhores condições de regeneração óssea que os tradicionais substitutos ósseos.



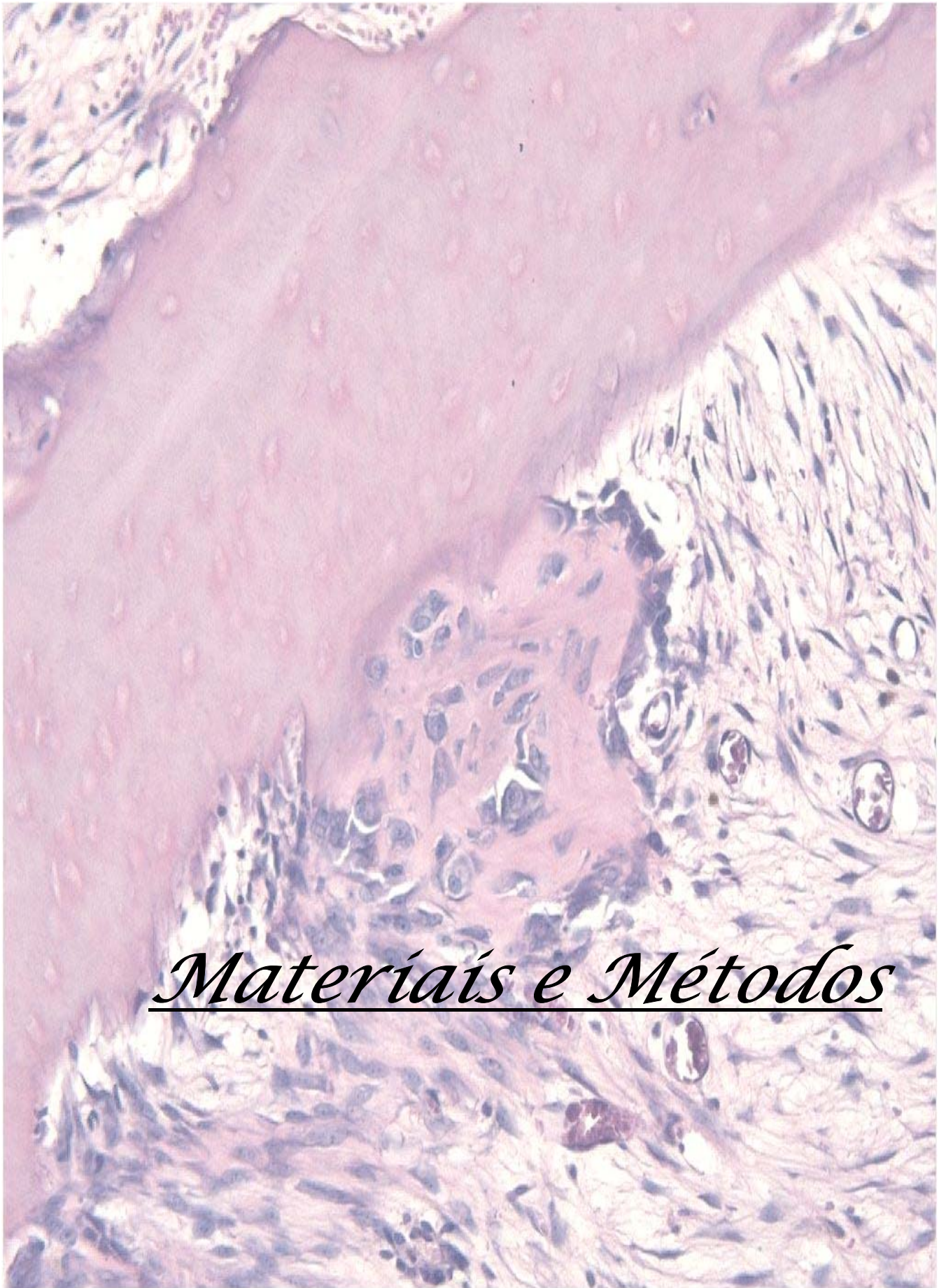
Proposição

3. Proposição

O objetivo do presente trabalho foi:

1. Avaliar qualitativamente e quantitativamente o osso reparacional em defeitos ósseos produzidos pela extração dental em ratos submetidos à administração diária de cafeína.
2. Avaliar histomorfometricamente a biocompatibilidade, a osteointegração e a capacidade osteogênica do implante/enxerto de osso autógeno provindo da calota craniana isoladamente, ou associado às células osteoblásticas em defeitos ósseos pós-extração dentária em ratos submetidos ou não ao tratamento com cafeína, bem como compará-los a dinâmica da reparação óssea alveolar.

Para tanto, foram realizadas as observações histológicas e histométricas dos tecidos reparacionais e dos materiais implantados/enxertados nos períodos de 7, 21 e 42 dias após a extração dentária.



Materiais e Métodos

4. *Materiais e Métodos*

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Todos os animais utilizados nesta pesquisa receberam cuidados humanos de acordo com o critério do Conselho Nacional de Pesquisa e o protocolo do estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética para uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Anexo).

Foram utilizados 126 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), pesando entre 200 a 300 gramas alimentados com ração balanceada 6042 Nuvilab CR-1 (Nuvital, Colombo-Paraná, Brasil); composta de farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral, aminoácidos, aditivo antioxidante; água e mantidos em caixas plásticas de 40x32x17 cm em condições controladas de iluminação (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (21°C a 25°C).

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais utilizados receberam previamente um vermífugo de uso animal, durante 3 dias, (Systemex - Schering do Brasil, São Paulo, Brasil).

Após um período de adaptação, os animais receberam injeções diárias intraperitonealmente de 30 mg/kg/dia de solução de cafeína a 1,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante trinta dias (Figura 1). Os controles receberam injeções de solução salina.



Figura 1: Frasco de cafeína em pó.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Soro (s): 21 ratos controles submetidos à administração de soro fisiológico e extração do incisivo superior direito.

Cafeína (cf): 21 ratos submetidos à administração de cafeína e extração do incisivo superior direito.

Soro + osso autógeno (s+oa): 21 ratos submetidos à administração de soro fisiológico, extração do incisivo superior direito e implantação de osso autógeno.

Cafeína + osso autógeno (cf+oa): 21 ratos submetidos à administração de cafeína, extração do incisivo superior direito e implantação de osso autógeno.

Soro + osso autógeno + células osteoblásticas (s+oa+co): 21 ratos submetidos à administração de soro fisiológico, extração do incisivo superior direito e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas.

Cafeína + osso autógeno + células osteoblásticas (cf+oa+co): 21 ratos submetidos à administração de cafeína, extração do incisivo superior direito e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas.

Todos os grupos receberam tratamento um mês antes da extração dentária e continuamente até serem sacrificados 7, 21 e 42 dias após o procedimento cirúrgico.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATOS

As células de medula óssea de ratos foram obtidas utilizando o método descrito por MANIATOPOULOS e cols. (1988) através de procedimentos realizados no Laboratório de Cultura de Células de Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 06 Ratos jovens variedade Wistar com cinco semanas de idade e pesando entre 100-120 gramas foram sacrificados e mergulhados em solução de álcool iodado 1%. Foi realizada anti-sepsia com clorexidina 2,5% e gaze esterilizada. Os fêmures foram removidos utilizando campos e instrumentos cirúrgicos esterilizados e armazenados em tubos de vidro de 25 ml com tampa rosqueável contendo 15 ml de meio de lavagem (α -MEM, fungizone e gentamicina, Gibco). Os fêmures foram transportados até a capela de fluxo laminar, lavados com álcool 70% e clorexidina 2,5% (1 minuto cada) em placas de Petri. Após este procedimento, foram realizadas três lavagens (remoção de excesso de tecido mole utilizando lâminas de bisturi nº 15) e uma lavagem em meio total suplementado, que induz a diferenciação de células-tronco em osteoblastos (α -MEM - Gibco), soro fetal bovino (Gibco), dexametasona (Sigma), ácido ascórbico (Gibco) e β -glicerofosfato (Sigma), segundo ROSA e BELOTI (2003), PITTENGER e cols. (1999). Os meios estavam aquecidos a 37°C. Em seguida foram cortadas as epífises dos fêmures com tesoura de ponta romba e a medula óssea lavada

utilizando seringa de 20 ml e agulha contendo MTS para coleta em tubos de centrífuga de 50 ml (1 tubo para cada fêmur). A suspensão de células foi então transferida para garrafas de 75 cm² contendo 20 ml de MTS (Figura 2). As garrafas foram armazenadas em uma incubadora a 37° C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco) e contadas utilizando um hemacitômetro para implantação nos defeitos ósseos (Figura 3).

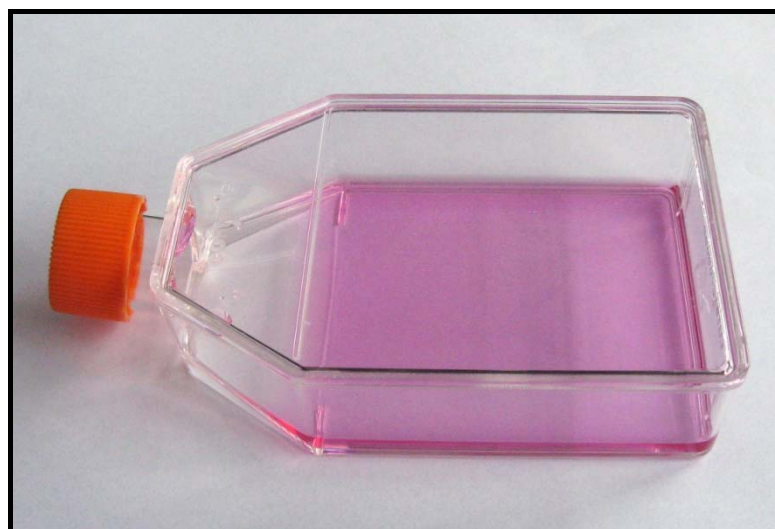


Figura 2: Garrafa contendo células osteoblásticas em MTS.

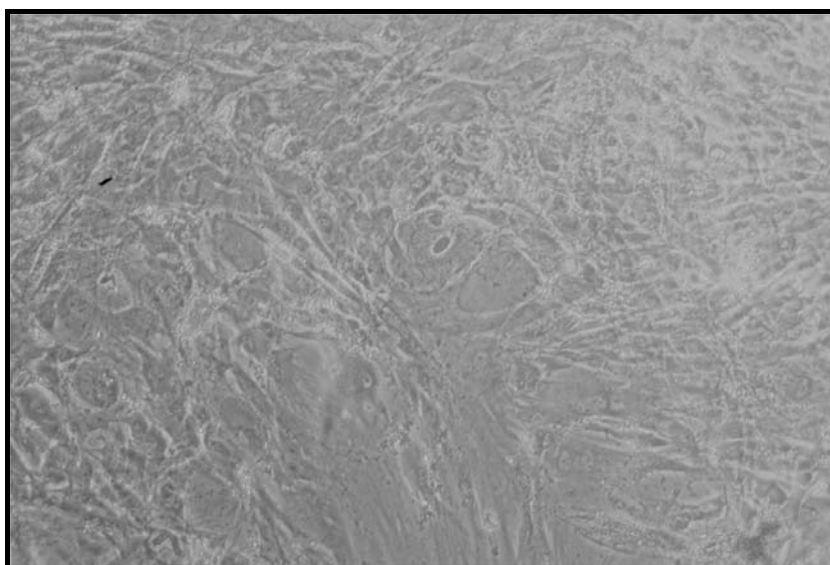


Figura 3: Células osteoblásticas em meio de cultura. Microscópio de fase, aumento de 40x.

4.4 EXTRAÇÃO DENTÁRIA

Após 30 dias, todos os animais foram anestesiados com 2,2,2 Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) administrado por via intraperitoneal, na dose de 25 mg/100 gramas de peso corporal.

Sob condições apropriadas de desinfecção e após a sindesmotomia da gengiva circundante e luxação os incisivos superiores direitos foram extraídos (Figuras 4, 5 e 6). Em seguida os tecidos moles foram suturados (Figura 7) com fio mononylon 4.0 (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil) e os animais receberam 0,2 ml de injeção intramuscular de Pentabiótico Veterinário, em dose única (Wyeth-São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

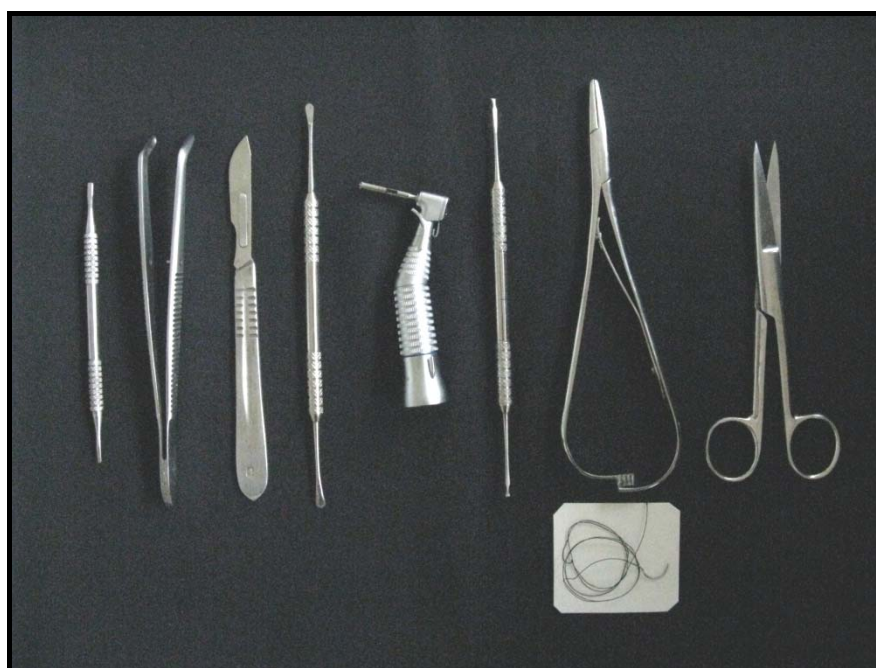


Figura 4: Instrumentais utilizados no procedimento cirúrgico.

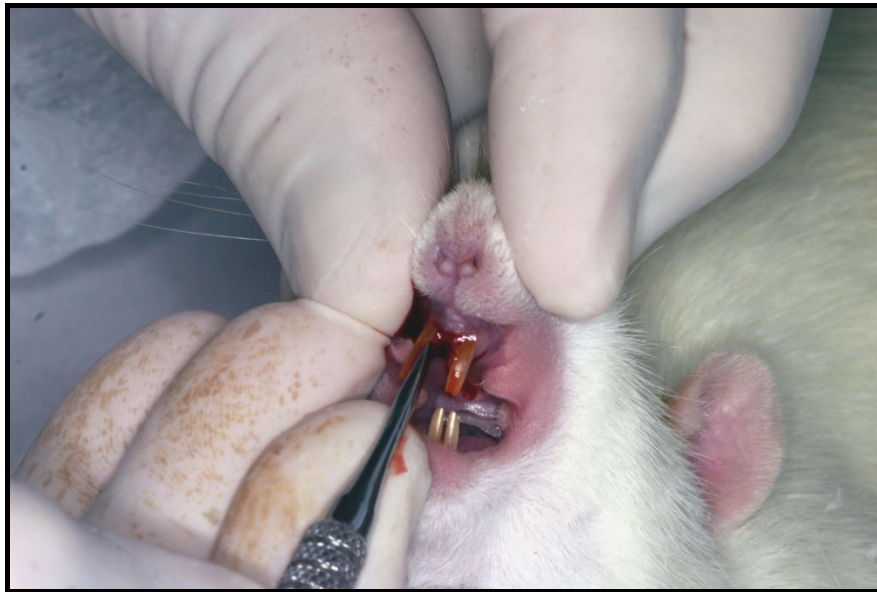


Figura 5: Sindesmotomia e luxação do incisivo superior direito.



Figura 6: Extração do incisivo superior direito.



Figura 7: Alvéolo suturado.

4.5 COLETA DO OSSO AUTÓGENO

Previamente ao procedimento foi realizada tricotomia, e anti-sepsia da área a ser operada com solução de polivinilpirrolidona iodo a 10%. Realizou-se uma incisão no plano sagital do crânio com lâmina de bisturi 15C respeitando os planos anatômicos, pele e periósteo, seguido pelo descolamento de um retalho de espessura total do lado direito até o arco zigomático, a fim de visualizar a área doadora (Figuras 8 e 9). Com a utilização de uma trefina de 5,0 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) foi realizada osteotomia no osso parietal sob abundante irrigação com NaCl a 0,9%, e remoção do fragmento com cinzel Micro Ochsenbein nº. 01 (Millennium Golgran, Pirituba, SP, Brasil) (Figuras 9 e 10). A ferida cirúrgica foi então suturada com fio mononylon 4.0 (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Subseqüentemente este osso foi temporariamente imerso em solução salina e células osteoblásticas, fracionado em um fragmento menor antes da implantação no local receptor (Figura 11).



Figura 8: Incisão no crânio por planos.

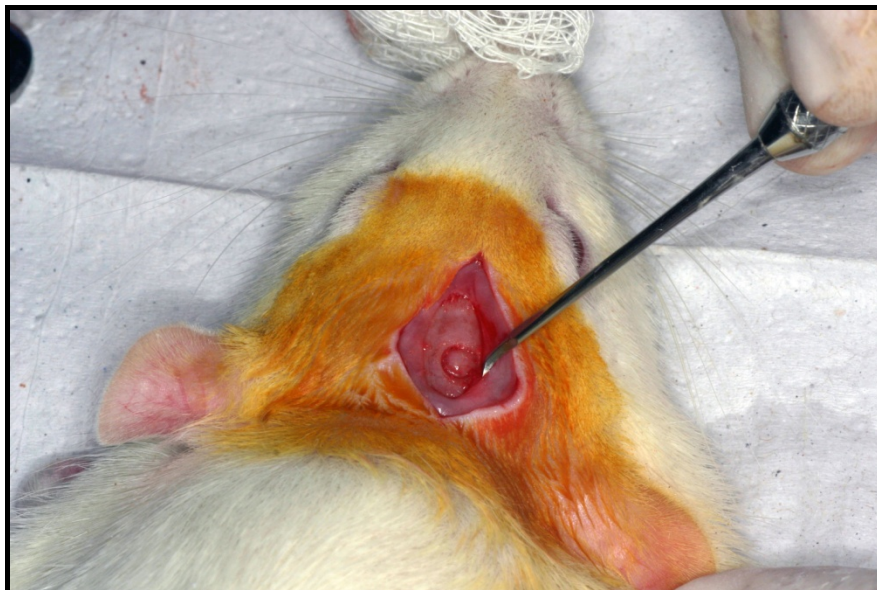


Figura 9: Exposição da área doadora e osteotomia.

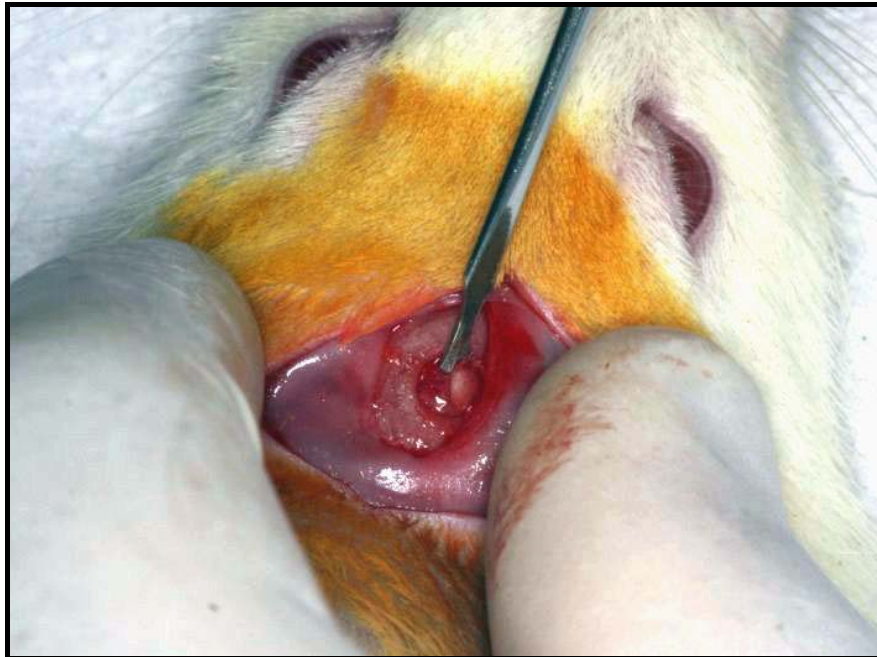


Figura 10: Remoção de fragmento do osso parietal.

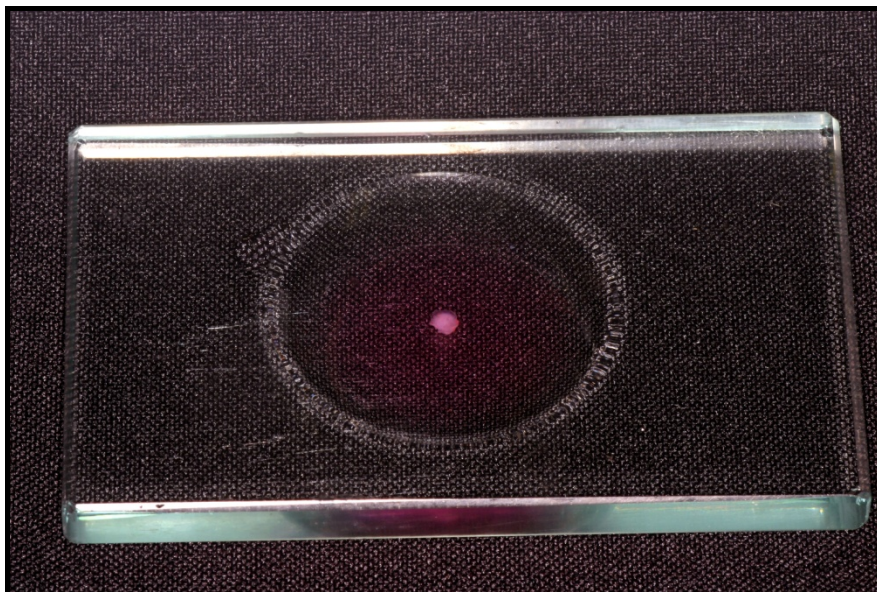


Figura 11: Fragmento ósseo mergulhado em meio de cultura.

4.6 IMPLANTE DOS BIOMATERIAIS

Nos grupos tratados com células osteoblásticas, estas foram inseridas no alvéolo dental com o auxílio de uma pipeta automática calibrada a injetar 50 μ l, o que equivale a uma quantidade de $3,3 \times 10^5$ células em meio de cultura (Figuras 12 e 13).

Os fragmentos ósseos retirados da calvária foram recortados com cinzel Micro Ochsenbein nº. 01 (Millennium Golgran, Pirituba, SP, Brasil) em tamanho de aproximadamente 1,0 x 2,0 mm. Após nova imersão em solução salina e células osteoblásticas, foram implantados no terço médio dos alvéolos dentais com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Logo em seguida ao procedimento os alvéolos foram suturados para assim manter o material confinado ao defeito ósseo (Figuras 14 e 15).

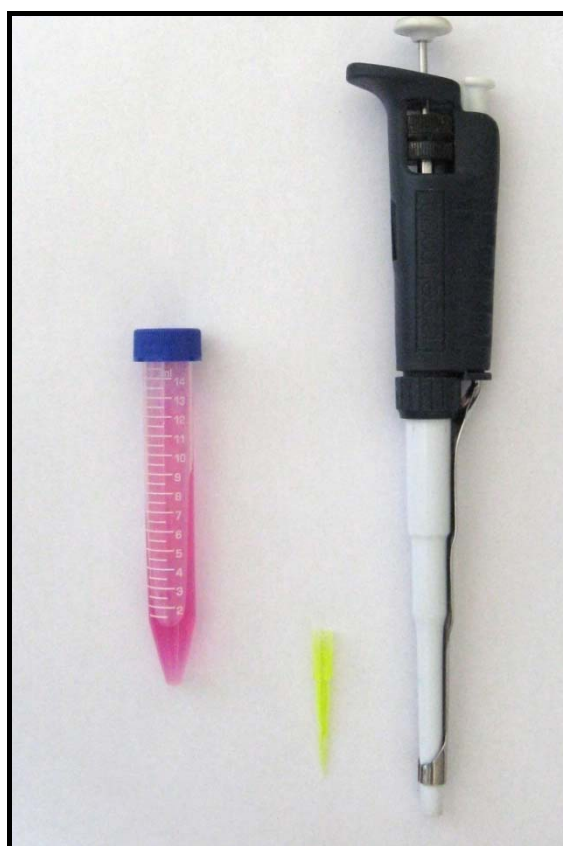


Figura 12: Células osteoblásticas em meio de cultura e pipeta para implantação.



Figura 13: Introdução no alvéolo dental das células osteoblásticas em meio de cultura.



Figura 14: Fragmento de osso autógeno recortado.

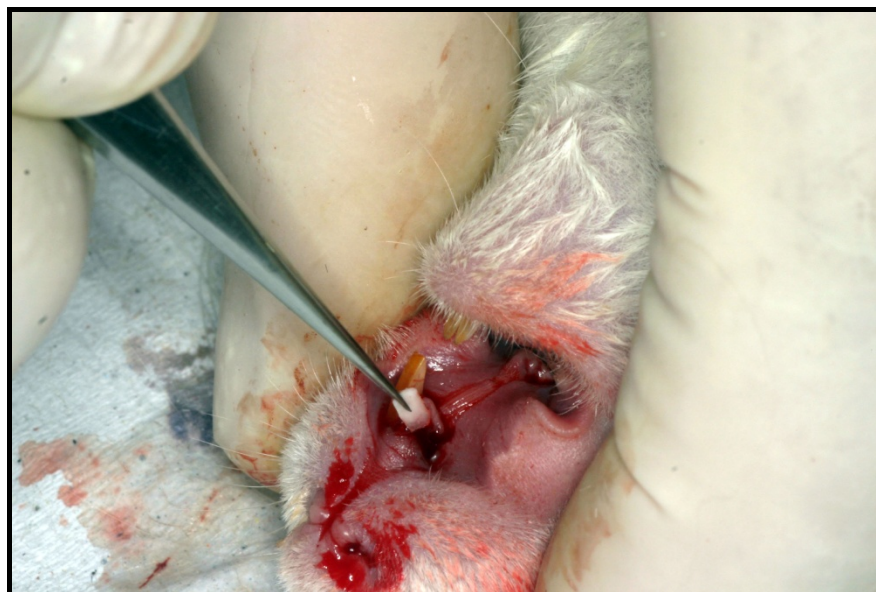


Figura 15: Implantação do fragmento de osso autógeno no alvéolo.

4.7 SACRIFÍCIO E COLETA DO MATERIAL

O sacrifício ocorreu por uma sobredose do mesmo anestésico no 7°, 21° e 42° dias após a extração (n=7 por grupo). As mandíbulas foram separadas das maxilas com o auxílio de uma tesoura, e a maxila direita foi separada da esquerda através de uma incisão ao nível do plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar utilizando uma lâmina de bisturi. Um corte com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares possibilitou a obtenção da peça com o alvéolo dental direito (figura 16).

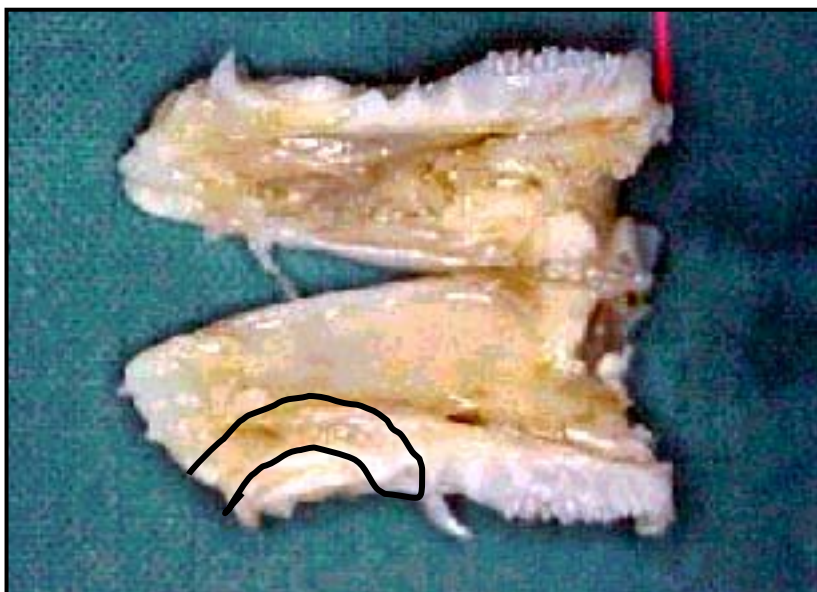


Figura 16: Obtenção da peça e representação esquemática do alvéolo.

4.8 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

As hemi-maxilas direitas foram imersas em formol a 10% para fixação, descalcificadas por 4 dias em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 30% (MORSE, 1945), lavadas por 24 horas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, incluídas em parafina e orientadas de maneira a permitir cortes longitudinais de 5 micrômetros de espessura, corados pela hematoxilina-eosina. Foram obtidos 20 cortes distanciados um do outro por um intervalo de 50 μm .

4.9 ANÁLISE HISTOMORFOMETRICA DOS ALVÉOLOS

Para facilitar o estudo, o alvéolo foi dividido em três terços: apical, médio e cervical. Utilizou-se para análise quantitativa dos tecidos um microscópio óptico Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar Germany). As imagens

foram capturadas através de uma câmara digital de vídeo Leica DFC 280 (Leica Microsystems Imaging AG, Cambridge, England), utilizando uma objetiva com aumento de 20X que foram introduzidas em computador com o auxílio de um software de captura e análise de imagens Leica Owin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England). As imagens foram analisadas obtendo-se a fração de volume (%) do osso trabecular, tecido conjuntivo e coágulo no interior do alvéolo.

Os cortes histológicos foram focalizados ao microscópio com objetiva de 20x e em cada alvéolo foram analisados 15 campos microscópicos (5 no terço apical, 5 no médio e 5 no cervical, mediante a utilização de uma grade colocada sobre os cortes (figura 17).

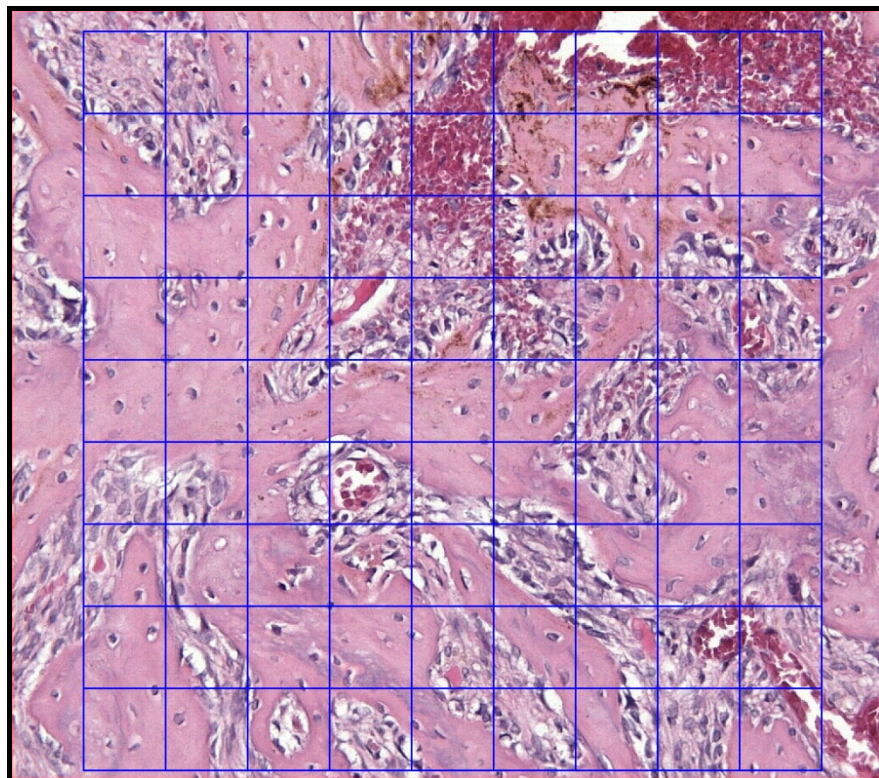


Figura 17: Grade

Essa grade consiste de um quadrado que limita a área teste, contendo 100 cruzamentos das linhas que pode ser utilizada para contar pontos, sobre uma

determinada estrutura histológica. Conhecida a área coberta pela grade foi possível estimar a densidade volumétrica do tecido ósseo, conjuntivo e coágulo sanguíneo nos diferentes períodos do estudo pela contagem de 1500 pontos por alvéolo analisado, correspondente ao produto de 5 campos microscópicos por terço, por 100 pontos (cruzamentos).

A fração de volume das diferentes estruturas foi estimada seguindo a fórmula da densidade volumétrica (Dv)

$$Dv = \frac{Pe}{Pt} \times 100$$

Pe = pontos na estrutura

Pt = pontos totais

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os resultados dos grupos foram realizadas pelos testes estatísticos não paramétrico de Mann-Whitney (comparações 2 a 2) e de Kruskal-Wallis (comparações múltiplas), considerando significativamente diferentes os grupos com $p \leq 0,05$ (SIEGEL, 1975).



Resultados

5. Resultados

5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

5.1.1. 7 dias

Grupo Soro (s)

Nos cortes histológicos dos alvéolos dos animais observou-se um preenchimento parcial com tecido conjuntivo cicatricial rico em fibroblastos, capilares e osso neoformado. O alvéolo encontrou-se parcialmente preenchido por delicadas trabéculas ósseas imaturas circundadas por osteoblastos, entremeadas com massas de coágulo em organização (Figura 18A).

Grupo Cafeína (cf)

Nos cortes histológicos dos alvéolos dos animais que foram submetidos à administração diária de cafeína observou-se um preenchimento com tecido conjuntivo cicatricial rico em fibroblastos, e uma grande quantidade de coágulos sanguíneos. O alvéolo encontrou-se preenchido por delicadas trabéculas ósseas imaturas em pequenas quantidades quando comparado ao grupo soro acima descrito (Figura 18B).

Grupo Soro + Osso autógeno (s+oa)

As avaliações histológicas demonstraram a presença do fragmento de osso implantado, que não foi reabsorvido, localizado no terço médio do alvéolo sem nenhuma reação inflamatória de corpo estranho (Figura 19A). Na superfície do remanescente do implante observou-se uma linha de cimentação que separa o novo tecido ósseo em deposição do antigo (Figura 19C). O alvéolo se apresentou

parcialmente preenchido por trabéculas ósseas neoformadas bem organizadas e circundadas por osteoblastos, entremeadas em um tecido conjuntivo maduro contendo remanescentes de coágulos sanguíneos (Figura 18C).

Grupo Cafeína + Osso autógeno (cf+oa)

Nos animais submetidos à administração de cafeína e a implantação do fragmento de osso autógeno pode ser observado para o período estudado, pequena quantidade de trabéculas ósseas neoformadas e grande quantidade de coágulo sanguíneo entremeadas por tecido conjuntivo (Figura 18D). O fragmento de osso autógeno localizado no terço médio do alvéolo apresentou reação inflamatória de corpo estranho, e pobre osseointegração (Figura 19B). Na superfície do tecido enxertado observam-se algumas lacunas de Howship, contendo osteoclastos reabsorvendo o tecido implantado (Figura 19D).

Grupo Soro + Osso autógeno + Células osteoblásticas (s+oa+co)

A imagem histológica deste grupo mostra um trabeculado de osso neoformado delicado e organizado em quantidades maiores do que o grupo tratado. Nota-se ainda um tecido conjuntivo maduro com algumas áreas de coágulos sanguíneos (Figura 18E). O enxerto de osso autógeno se mostrou circundado por um tecido conjuntivo sem reações inflamatórias, e na sua superfície trabéculas ósseas neoformadas originando a partir do fragmento implantado (Figura 20A).

Grupo Cafeína + Osso autógeno + Células osteoblásticas (cf+oa+co)

Foi observado neste grupo, tecido ósseo trabecular bem formado circundado por um tecido conjuntivo contendo grande quantidade de coágulo sanguíneo (Figura 18F). O fragmento ósseo mostrou-se envolto por uma intensa reação inflamatória de corpo estranho e com áreas de reabsorção (Figura 20B).

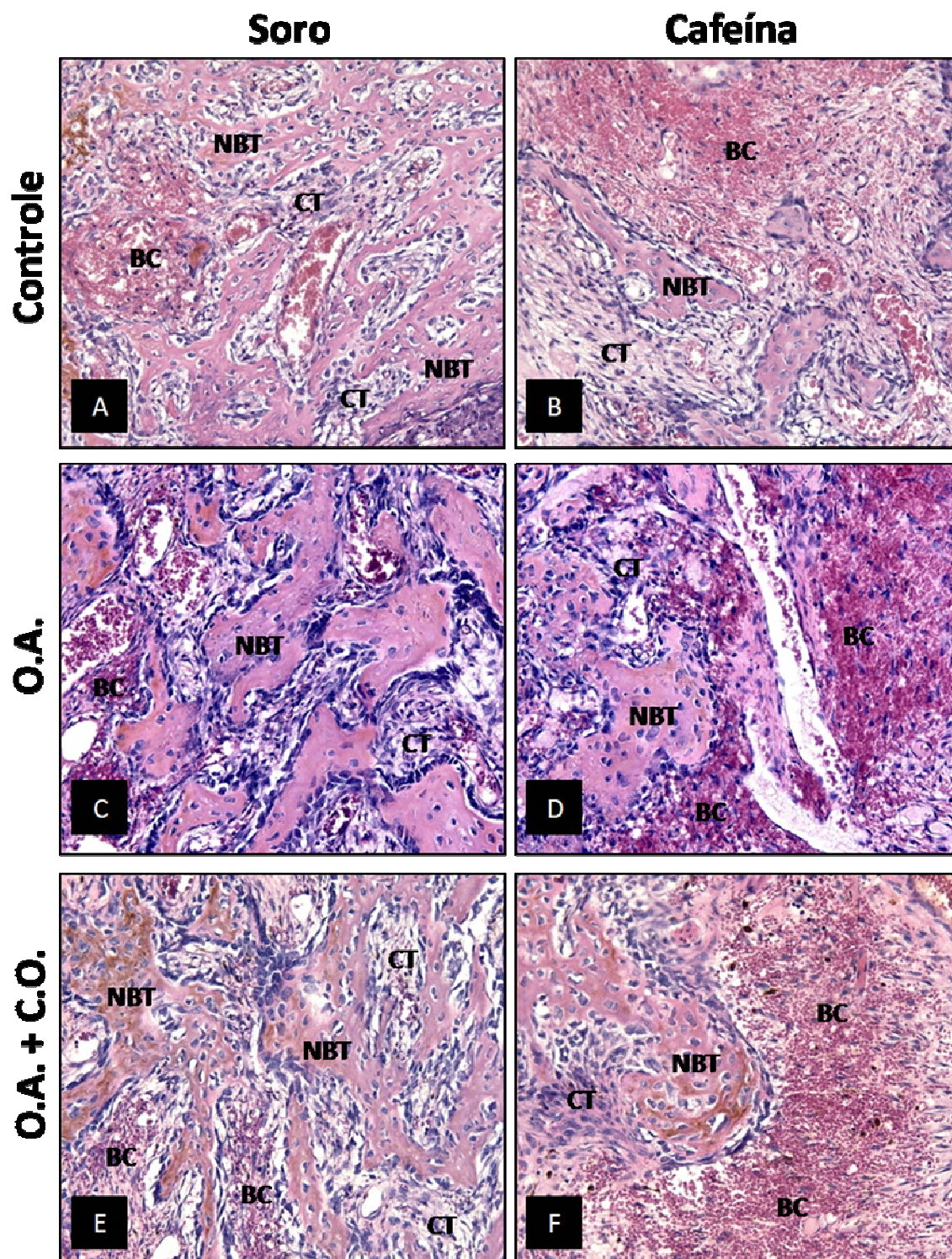


Figura 18: Cortes histológicas do terço médio alveolar dos grupos controle, osso autógeno, osso autógeno + células osteoblásticas de animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC). Hematoxilina-eosina (aumento de 250x).

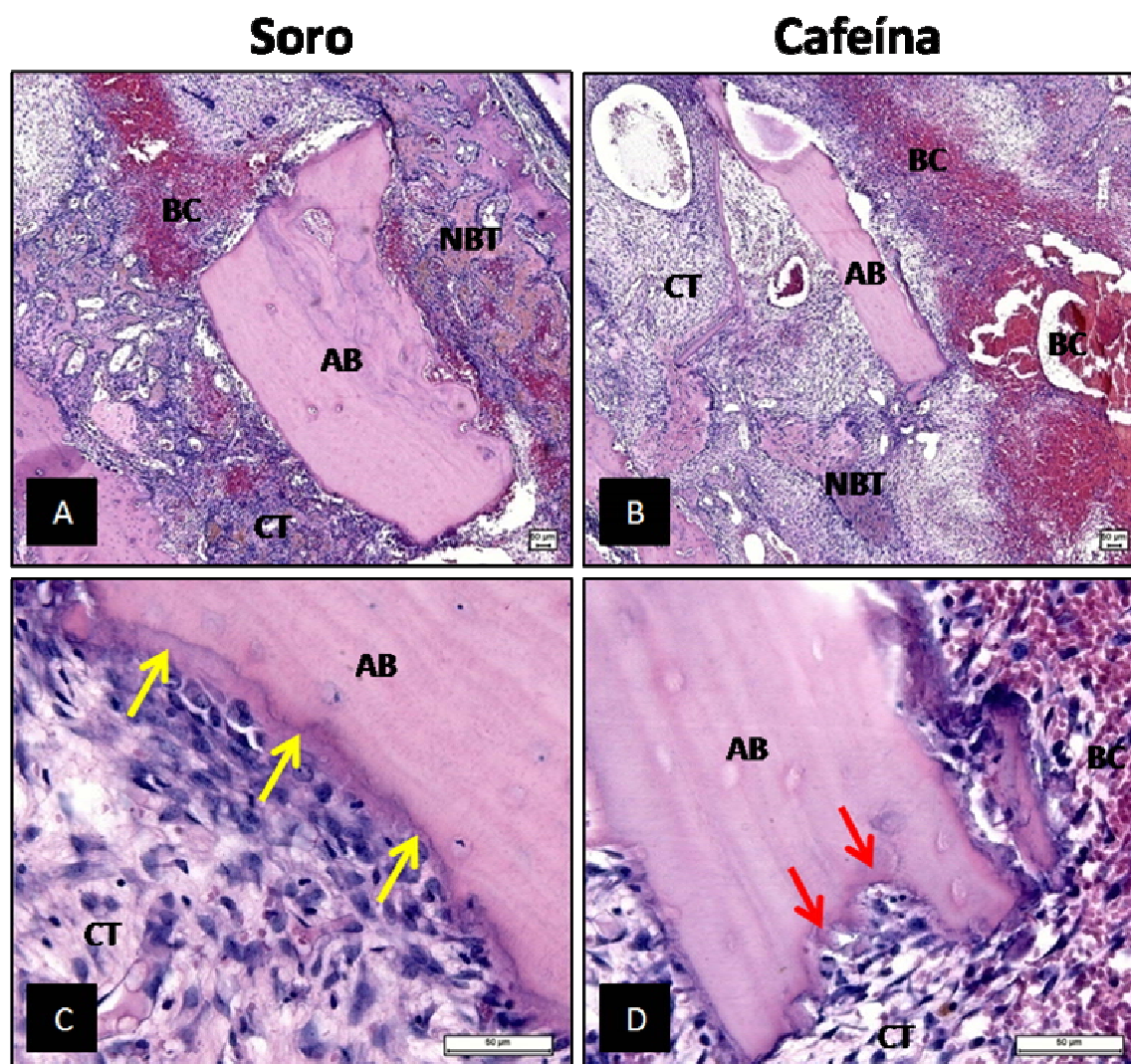


Figura 19: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC); Osso autógeno (AB); Linha de cimentação (Setas Amarelas); Lacunas de Howship (Setas vermelhas). Hematoxilina-eosina (aumento: A e B - 62,5x; C e D - 500x).

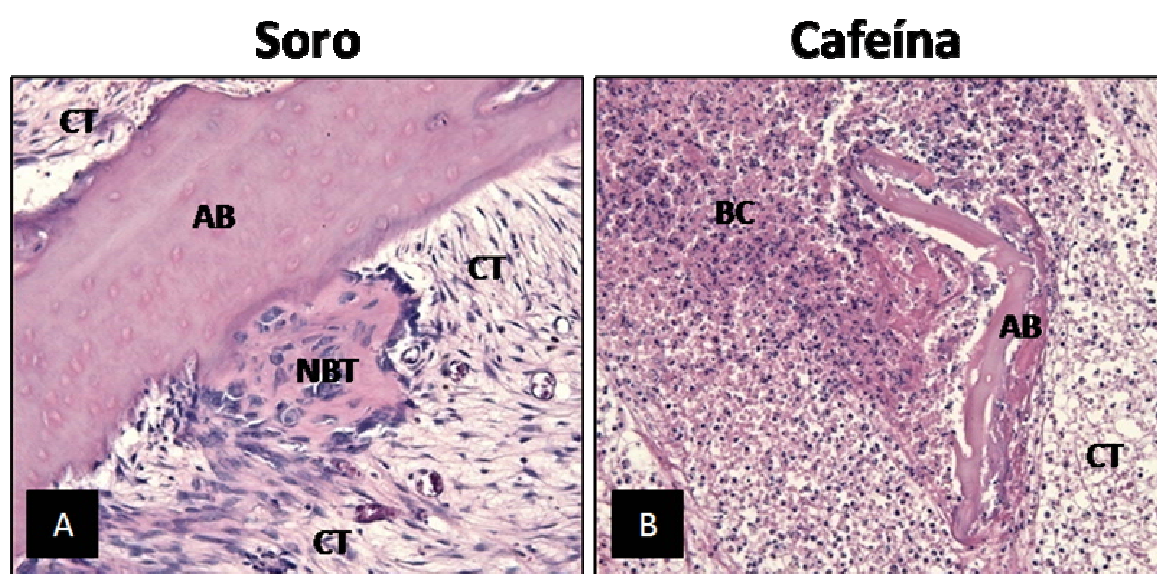


Figura 20: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado juntamente com as células osteoblásticas no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC); Osso autógeno (AB). Hematoxilina-eosina (aumento: A e B - 250x).

5.1.2. 21 dias

Grupo Soro (s)

A reparação óssea observada, principalmente nos terços apical e cervical dos animais que receberam soro fisiológico, estava composta por trabéculas ósseas mais espessas envolvidas por osteoblastos. A quantidade de tecido conjuntivo se mostrou bem menor do que no período anterior (7 dias) e uma pequena quantidade de coágulo sanguíneo ainda se mostrava em processo de reabsorção (Figura 21A).

Grupo Cafeína (cf)

Nos animais submetidos à administração diária de cafeína, quando comparados aos animais do grupo soro, observou-se trabéculas ósseas menos maduras e em menor número envolvidas por um tecido conjuntivo contendo grande quantidade de coágulos sanguíneos para o período em questão (Figura 21B).

Grupo Soro + Osso autógeno (s+oa)

O alvéolo se apresentou preenchido por trabéculas ósseas maduras bem delimitadas e organizadas, juntamente com um tecido conjuntivo maduro com pequenas quantidades de coágulos sanguíneos (Figura 21C). As observações histológicas do osso autógeno implantado mostraram uma neoformação óssea com trabéculas maduras ao redor do fragmento compatível com uma boa osteointegração (Figuras 22A, C).

Grupo Cafeína + Osso autógeno (cf+oa)

Nos animais submetidos à administração de cafeína e a implantação do fragmento de osso autógeno observou-se trabéculas ósseas menos maduras que no grupo descrito acima, contendo ainda coágulos sanguíneos ocupando grande parte do alvéolo (Figura 21D). A análise do fragmento de osso autógeno mostrou pouca quantidade de tecido ósseo neoformado ao seu redor, reação inflamatória de corpo estranho em alguns pontos e osteoclastos em processo reabsortivo ósseo (Figuras 22B, D).

Grupo Soro + Osso autógeno + Células osteoblásticas (s+oa+co)

Neste período a análise qualitativa dos alvéolos mostrou um trabeculado de osso maduro circundado por tecido conjuntivo com pequenas áreas de coágulos sanguíneos (Figura 21E). O enxerto de osso autógeno se mostrou circundado por grande quantidade de trabéculas ósseas em processo de formação. A superfície do fragmento mostrou perfeita união entre o material enxertado e o tecido ósseo neoformado (Figuras 23A, B).

Grupo Cafeína + Osso autógeno + Células osteoblásticas (cf+oa+co)

Na análise deste grupo foram observadas trabéculas ósseas menores quando comparadas ao grupo acima, e em algumas áreas do alvéolo observou-se ainda coágulos sanguíneos entremeados em um tecido conjuntivo maduro (Figura 21F). O fragmento de osso autógeno enxertado se mostrou circundado por pequena quantidade de tecido ósseo neoformado e apresentando ainda reação inflamatória em alguns pontos de sua superfície (Figuras 23B, D).

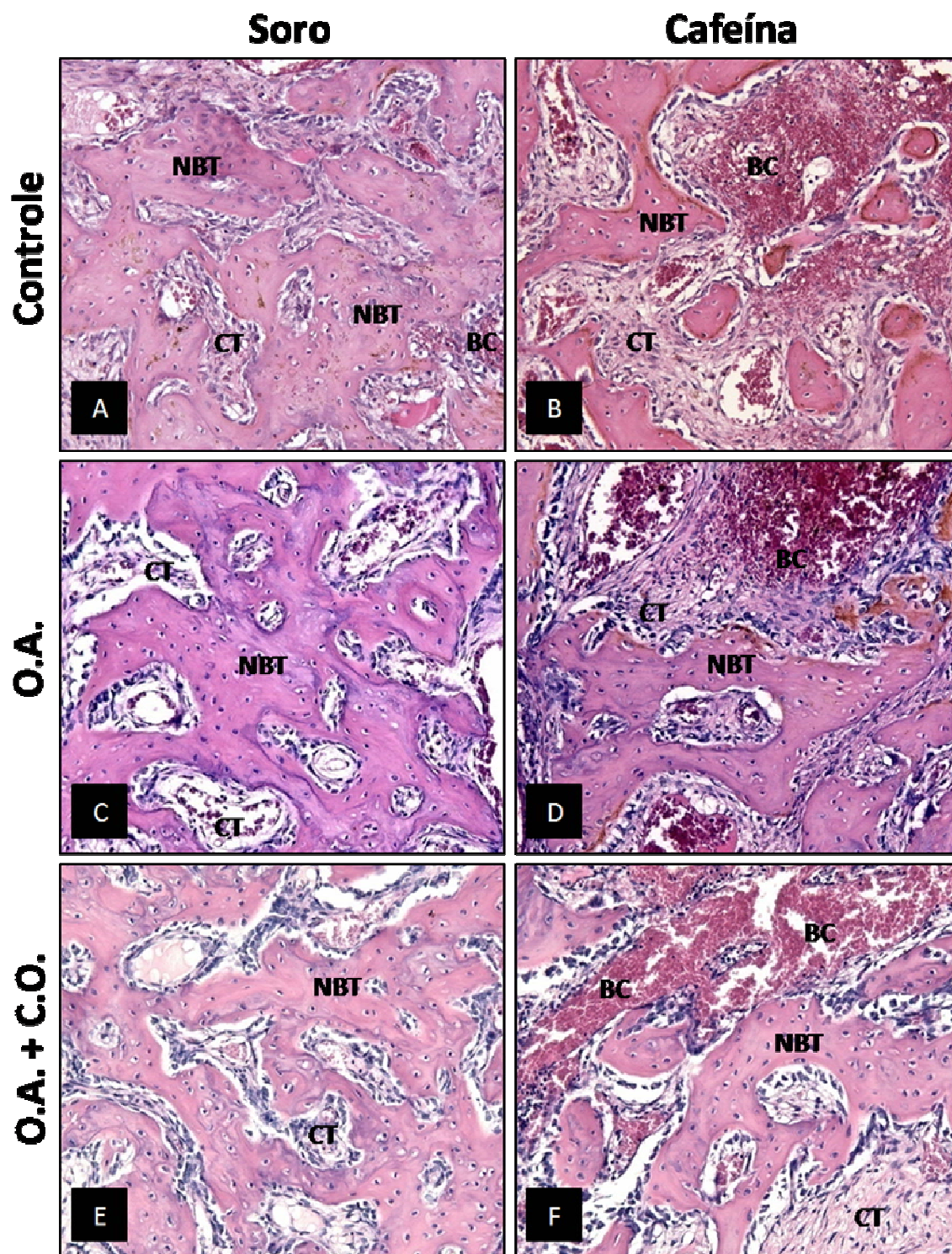


Figura 21: Cortes histológicos do terço médio alveolar dos grupos controle, osso autógeno, osso autógeno + células osteoblásticas de animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. Tecido ósseo (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC). Hematoxilina-eosina (aumento de 250x).

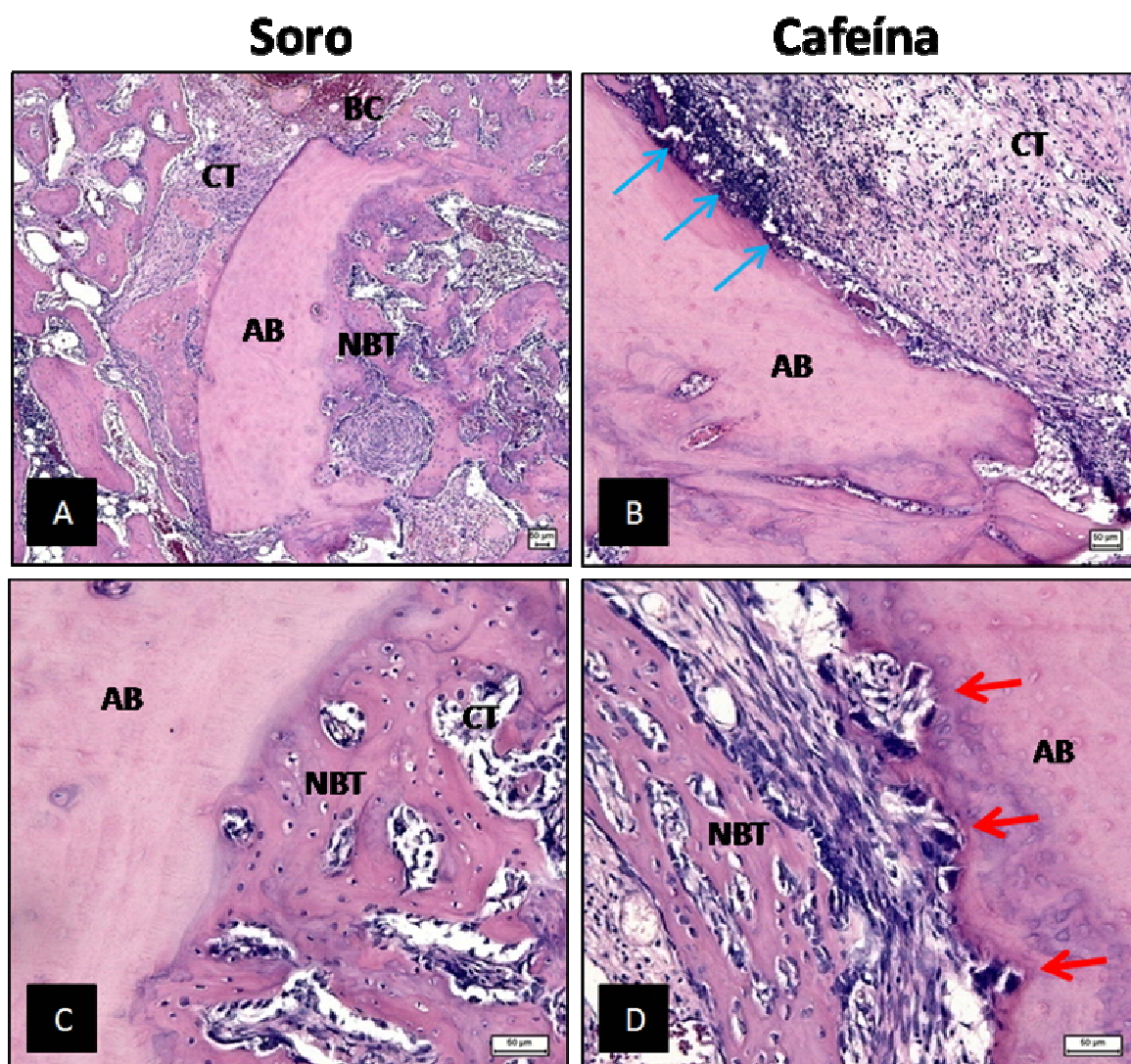


Figura 22: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC); Enxerto ósseo (BG); Reação inflamatória (Setas azuis); Lacunas de Howship (Setas vermelhas). Hematoxilina-eosina (aumento: A - 62,5x; B - 125x; C e D - 250x).

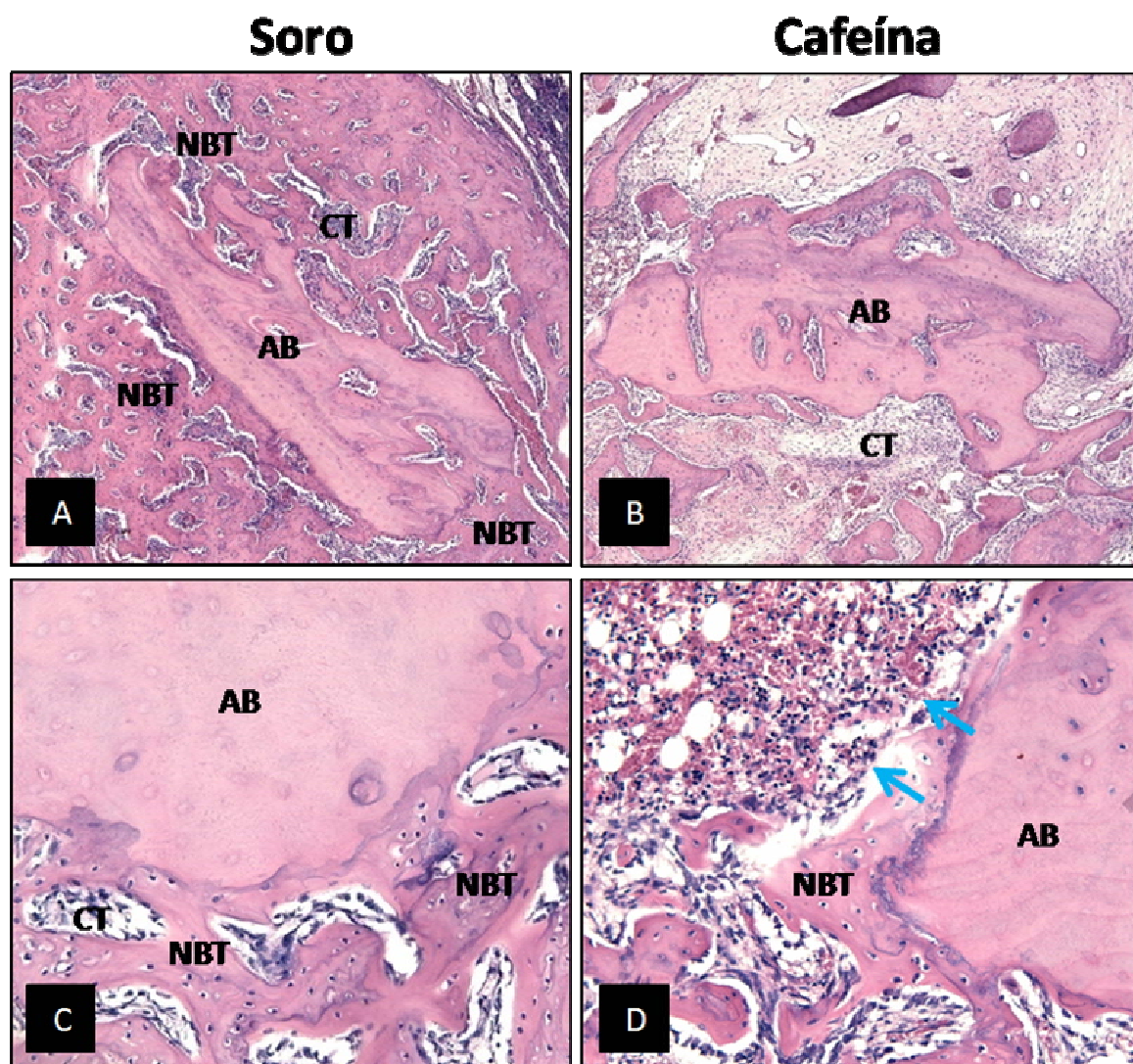


Figura 23: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado juntamente com as células osteoblásticas no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Osso autógeno (AB); Reação inflamatória (Setas azuis). Hematoxilina-eosina (aumento: A e B - 62,5x; C e D - 250x).

5.1.3. 42 dias

Grupo soro (s)

A avaliação histológica mostrou um trabeculado ósseo compacto e espesso entremeado por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo maduro preenchendo totalmente os alvéolos (Figura 24A).

Grupo Cafeína (cf)

Nos animais submetidos à administração diária de cafeína, também foi possível notar trabéculas ósseas compactas e espessas, mas em proporções bem menores que no grupo soro. Remanescentes de coágulo sanguíneo ainda podem ser observados em alguns pontos de um conjuntivo maduro (Figura 24B).

Grupo Soro + Osso autógeno (s+oa)

Nestes animais os alvéolos se apresentaram preenchidos por trabéculas ósseas maduras, espessas, bem delimitadas e organizadas, entremeadas em um tecido conjuntivo maduro com quantidades pequenas de coágulos sanguíneos para o período estudado (Figura 24C). As avaliações histológicas do fragmento ósseo da calota craniana enxertado no alvéolo mostraram uma intensa neoformação óssea ao redor de todo o implante, com uma matriz óssea histologicamente compatível com consolidação e osteointegração (Figuras 25A, C).

Grupo Cafeína + Osso autógeno (cf+oa)

A cicatrização óssea nestes animais mostrou também um trabeculado maduro, mas em quantidades menores que nos animais acima explanados, com a

presença ainda de coágulos sanguíneos distribuídos em um tecido conjuntivo com boa organização (Figura 24D). O tecido ósseo enxertado mostrou-se à análise histológica sem reação inflamatória no conjuntivo ao seu redor, e com pequena quantidade de tecido ósseo neoformado na sua periferia (Figuras 25B, D).

Grupo Soro + Osso autógeno + Células osteoblásticas (s+oa+co)

Neste período a análise qualitativa mostrou os alvéolos na sua grande parte preenchidos por um tecido ósseo espesso, compacto e bem organizado, sem coágulos sanguíneos e com diminutas quantidades de tecido conjuntivo (Figura 24E). O fragmento de osso autógeno enxertado no terço médio do alvéolo se mostrou totalmente envolvido por tecido ósseo reparacional (Figura 25, C).

Grupo Cafeína + Osso autógeno + Células osteoblásticas (cf+oa+co)

Da mesma forma que no grupo anterior o alvéolo se mostrou totalmente preenchido por trabéculas ósseas e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo sem coágulos sanguíneos (Figura 24F). O tecido ósseo enxertado se mostrou circundado por novo osso, mas em quantidades menores que o grupo anterior (Figuras 23B, D).

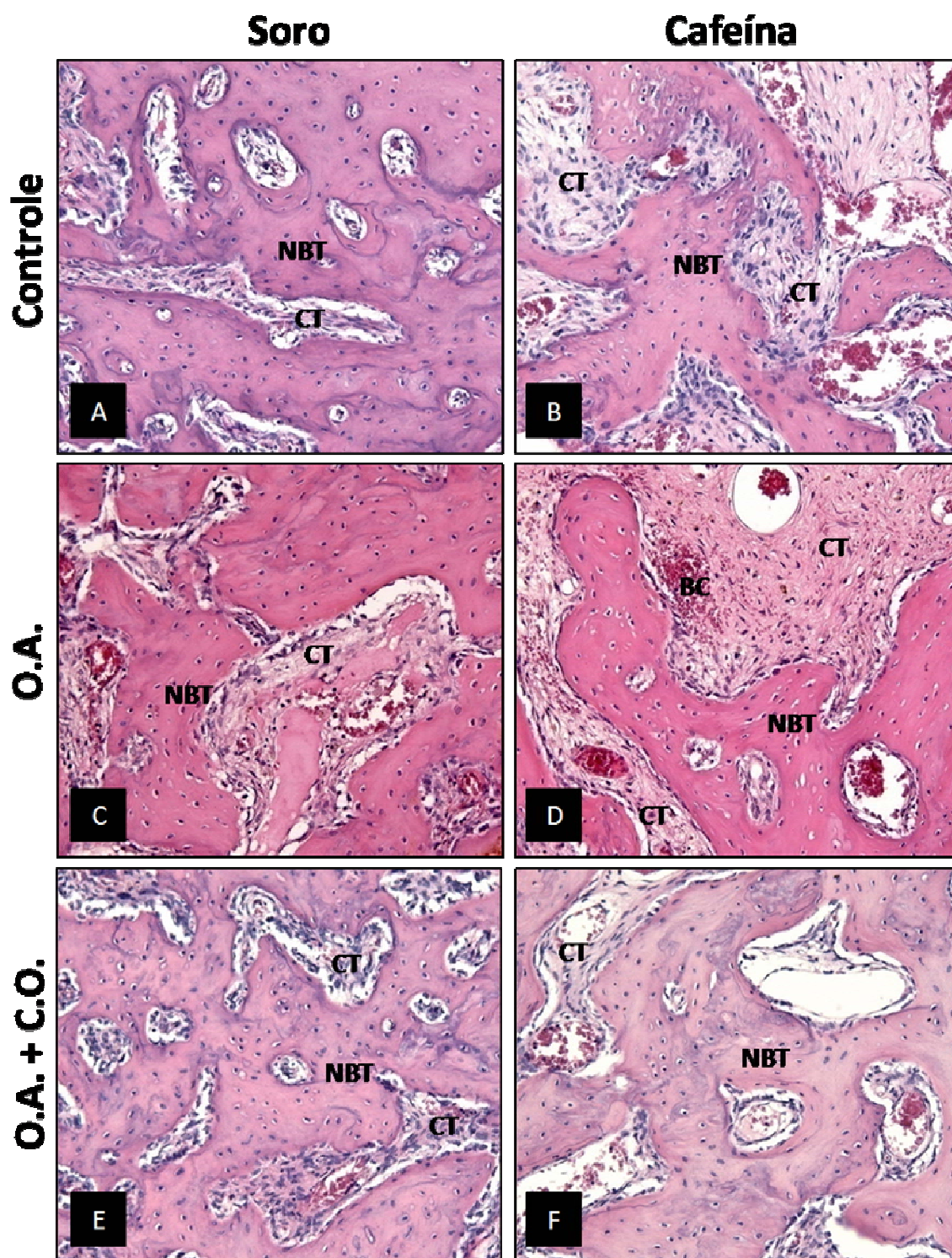


Figura 24: Cortes histológicos do terço médio alveolar dos grupos controle, osso autógeno, osso autógeno + células osteoblásticas de animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **42 dias** após a extração dental. Tecido ósseo (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC). Hematoxilina-eosina (aumento de 250x).

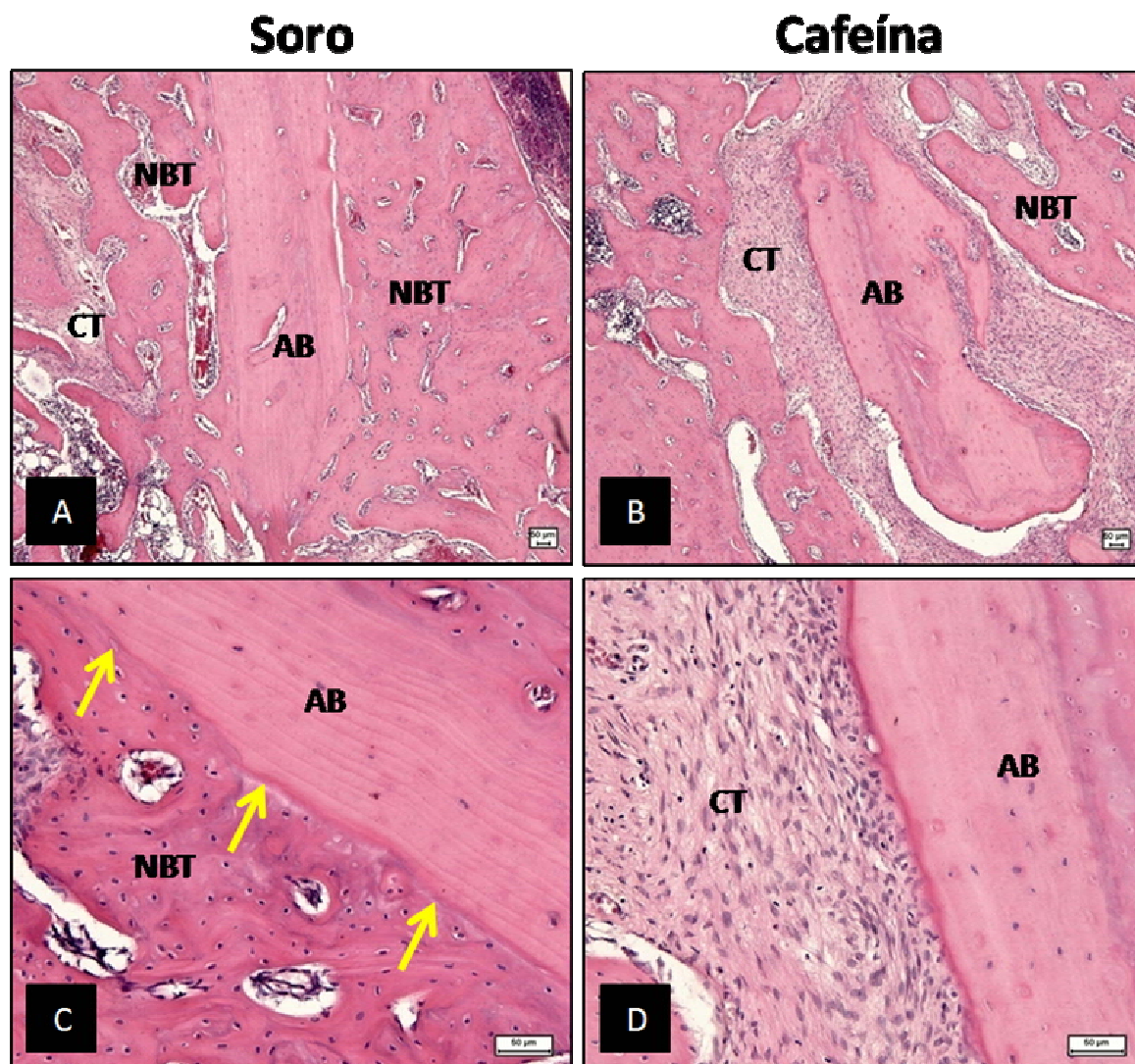


Figura 25: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, 42 dias após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Coágulo sanguíneo (BC); Osso autógeno (AB); Interface enxerto/tecido ósseo neoformado (Setas amarelas). Hematoxilina-eosina (aumento: A e B - 62,5x; C e D - 250x).

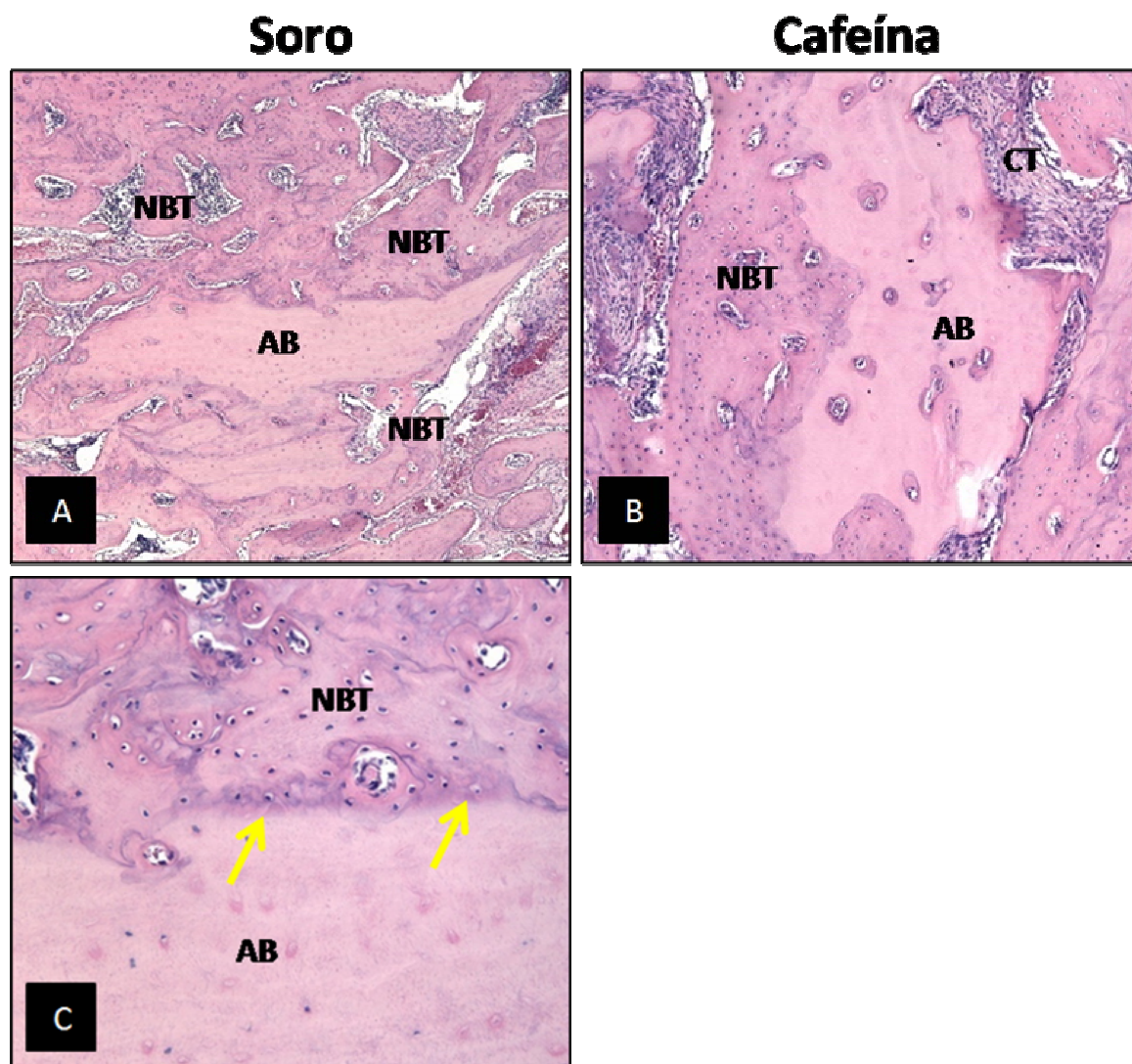


Figura 26: Cortes histológicos do fragmento de osso autógeno implantado juntamente com as células osteoblásticas no terço médio alveolar dos animais submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **42 dias** após a extração dental. Tecido ósseo neoformado (NBT); Tecido conjuntivo (CT); Osso autógeno (AB); Interface enxerto/tecido ósseo neoformado (Setas amarelas). Hematoxilina-eosina (aumento: A - 62,5x; B - 125x; C - 250x).

5.2. RESULTADOS HISTOMÉTRICOS

5.2.1. *Tecido Ósseo*

Na tabela 1 e na figura 27 são expressos os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **tecido ósseo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Pode-se observar uma menor quantidade de formação de tecido ósseo (significante a 1%) em todos os 3 grupos dos animais submetidos ao tratamento com cafeína quando comparados aos tratados com soro fisiológico.

A tabela 2 e a figura 28 mostram os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **tecido ósseo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **21 dias** após a extração dental. Os dados analisados mostram menor neoformação óssea (significante a 1%) em todos os 3 grupos (C, OA e OA+CO) dos animais submetidos ao tratamento com cafeína quando comparados aos tratados com soro fisiológico.

Os dados contidos na tabela 3 e ilustrados na figura 29 demonstram os valores percentuais médios e erro padrão da média de **tecido ósseo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. Os resultados mostraram uma maior porcentagem de tecido ósseo quando comparados aos períodos de 7 e 21

dias, independente do tratamento utilizado. Na análise feita, aos 42 dias menor porcentagem óssea foi encontrada, nos 3 grupos analisados (C, OA e OA+CO), quando a administração de cafeína era feita. A aplicação do teste estatístico acusou significância estatística a 1% apenas para os grupos controle e implantação de osso autógeno, no grupo onde foi realizada a implantação do osso autógeno associado às células osteoblásticas não houve diferenças significantes quando se comparou o tratamento com cafeína ao soro fisiológico.

A análise estatística através de comparações múltiplas entre os grupos estudados nos períodos de 7, 21 e 42 dias, quanto à porcentagem volumétrica de tecido ósseo foi realizada através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, levando em consideração níveis de significância de 1% e 5% (Tabela 4).

Tabela 1: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido ósseo dos grupos: controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Ósseo - 7 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	33,744 ± 1,29	35,907 ± 1,39	32,91 ± 2,07
Cafeína	18,99 ± 1,13**	21,433 ± 1,33**	15,817 ± 1,86**

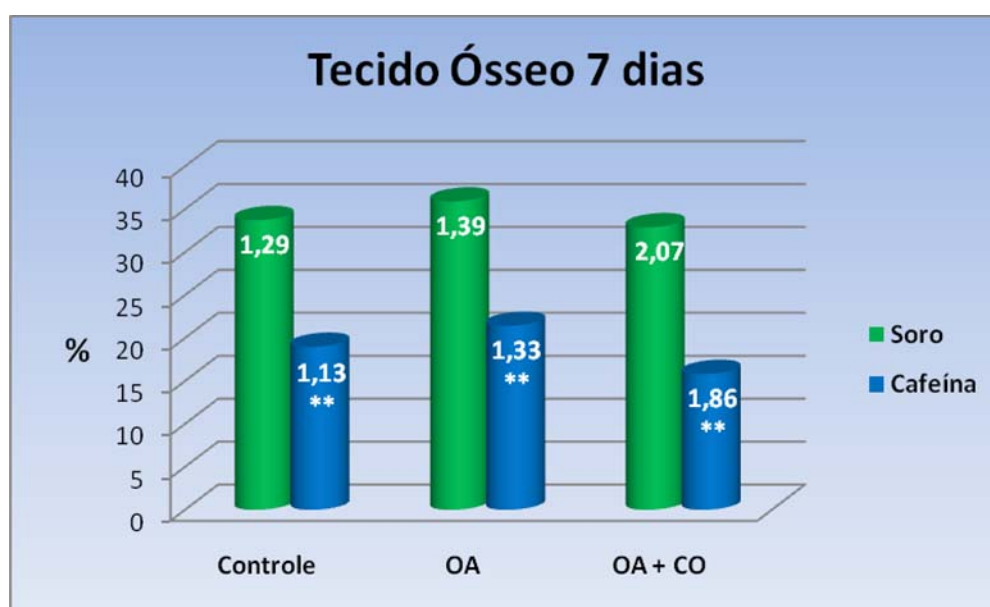


Figura 27: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 2: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido ósseo dos grupos: controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **21 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Ósseo - 21 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	58,413 ± 1,2	54,427 ± 1,22	55,3 ± 1,22
Cafeína	28,747 ± 1,29**	31,347 ± 1,62**	24,213 ± 1,48**

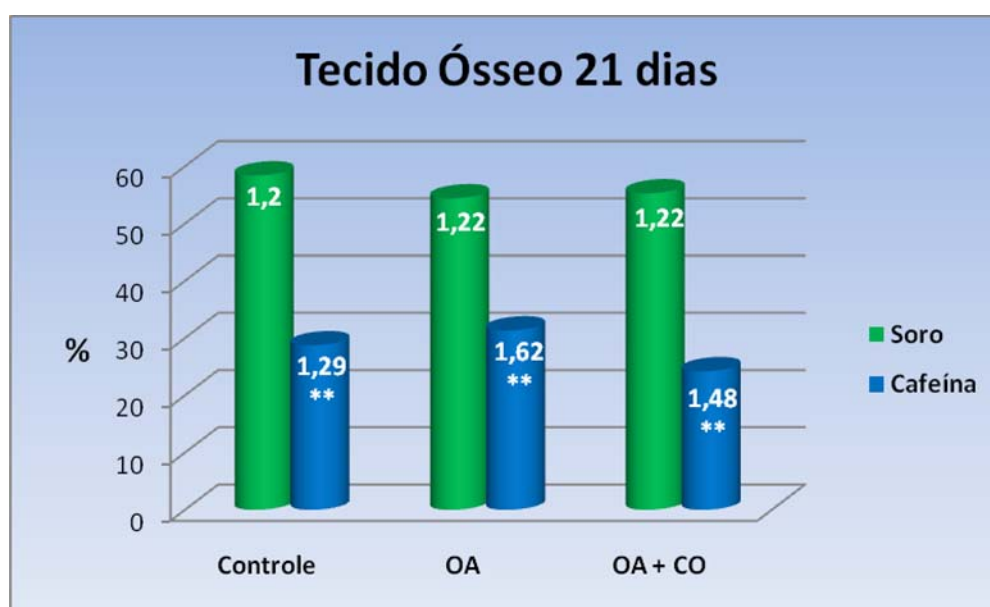


Figura 28: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 3: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido ósseo dos grupos: controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Ósseo - 42 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	72,133 ± 1,73	62,283 ± 2,01	71,04 ± 1,37
Cafeína	37,711 ± 2,3**	36,28 ± 1,7**	69,033 ± 1,44

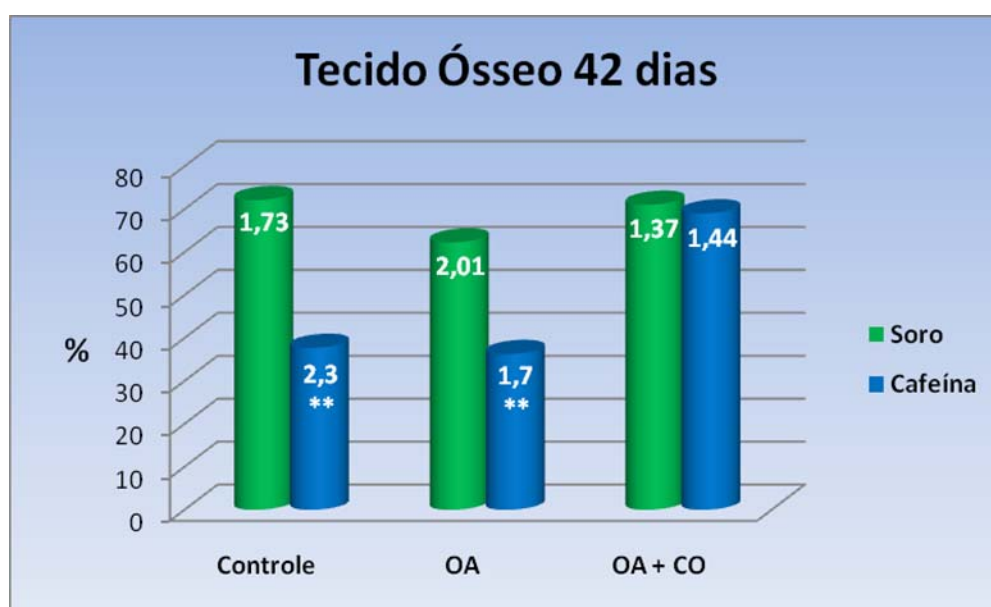


Figura 29: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido ósseo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **42 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 4: Comparações múltiplas entre os diversos grupos estudados através do teste estatístico Kruskal-Wallis para a porcentagem de tecido ósseo em 7, 21 e 42 dias (significância descrita na tabela). S – soro; CF – cafeína; OA – osso autógeno; CO – células osteoblásticas.

Tecido Ósseo			
Grupos	7 dias	21 dias	42 dias
S x CF	1%	1%	1%
S x OA	n.s.	5%	1%
S x OACF	1%	1%	1%
S x CO	n.s.	n.s.	n.s.
S x COCF	1%	1%	n.s.
CF x OA	1%	1%	1%
CF x OACF	n.s.	n.s.	n.s.
CF x CO	1%	1%	1%
CF x COCF	n.s.	5%	1%
OA x OACF	1%	1%	1%
OA x CO	n.s.	n.s.	1%
OA x COCF	1%	1%	1%
OACF x CO	1%	1%	1%
OACF x COCF	1%	1%	1%
CO x COCF	1%	1%	n.s.

5.1.3. *Tecido Conjuntivo*

A tabela 5 e a figura 30 mostram os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **tecido conjuntivo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Os dados evidenciam menor quantidade de tecido conjuntivo nos grupos que receberam o tratamento com cafeína quando comparados aos que receberam soro fisiológico, sendo esta diferença estatisticamente significativa (1%) apenas para o grupo controle.

Na tabela 6 e na figura 31 são mostrados os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **tecido conjuntivo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, 21 dias após a extração dental. As avaliações histométricas dos alvéolos mostraram maior quantidade de tecido conjuntivo nos grupos de animais tratados com cafeína, sendo esta diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% tanto no grupo controle quanto nos grupos com implantação de osso autógeno. A comparação com os animais do período anterior revela uma menor quantidade de tecido conjuntivo para os animais que receberam o soro fisiológico, e inversamente maior para os tratados com cafeína.

Os dados da tabela 7 e as ilustrações da figura 32 mostram os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **tecido conjuntivo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína

ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. Quando comparados os animais, pode ser observada uma maior quantidade de tecido conjuntivo naqueles que receberam cafeína, apenas no grupo OA+CO não houve diferenças estatisticamente significantes, o restante obteve diferenças a 1%.

A análise estatística através de comparações múltiplas entre os grupos estudados nos períodos de 7, 21 e 42 dias, quanto à porcentagem volumétrica de tecido conjuntivo foi realizada através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, levando em consideração níveis de significância de 1% e 5% (tabela 8).

Tabela 5: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido conjuntivo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Conjuntivo - 7 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	54,444 ± 1,28	45,167 ± 1,75	47,2 ± 2,41
Cafeína	41,371 ± 1,89**	43,633 ± 2,58	41,517 ± 3,22



Figura 30: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido conjuntivo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 6: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido conjuntivo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **21 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Conjuntivo - 21 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	39,92 ± 1,07	40,96 ± 1,19	42,817 ± 1,22
Cafeína	53,89 ± 2,36**	52,027 ± 2,27**	54,147 ± 2,97**



Figura 31: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido conjuntivo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 7: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de tecido conjuntivo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). ** significante a 1%.

Tecido Conjuntivo - 42 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	28,089 ± 1,79	36,7 ± 1,96	28,667 ± 1,4
Cafeína	60,978 ± 2,37**	54,52 ± 1,99**	29,717 ± 1,4

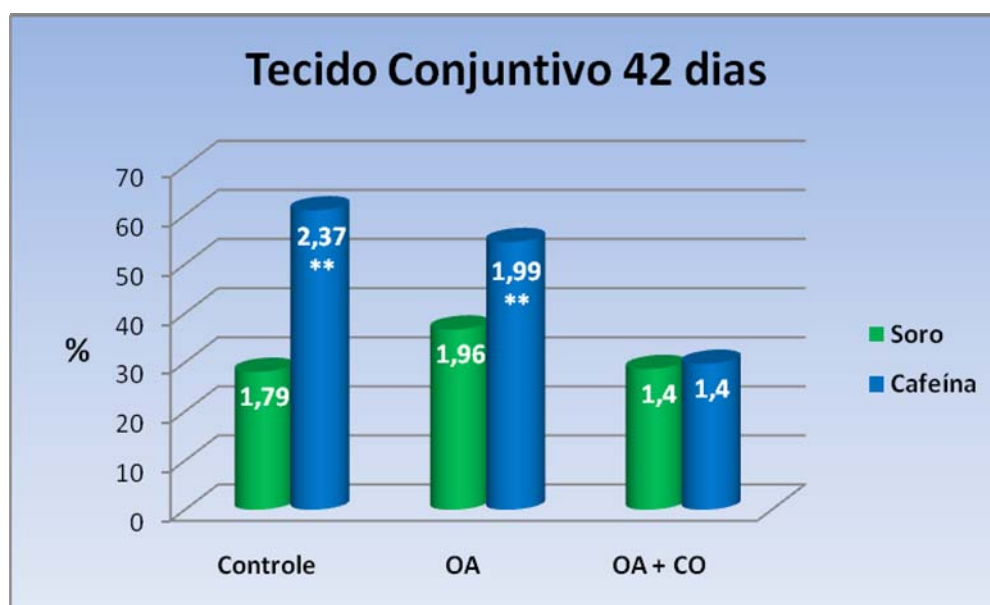


Figura 30: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de tecido conjuntivo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **42 dias** após a extração dental. ** significante a 1%.

Tabela 8: Comparações múltiplas entre os diversos grupos estudados através do teste estatístico Kruskal-Wallis para a porcentagem de tecido conjuntivo em 7, 21 e 42 dias (significância descrita na tabela). S – soro; CF – cafeína; OA – osso autógeno; CO – células osteoblásticas.

Tecido Conjuntivo			
Grupos	7 dias	21 dias	42 dias
S x CF	1%	1%	1%
S x OA	1%	n.s.	1%
S x OACF	1%	1%	1%
S x CO	1%	n.s.	n.s.
S x COCF	1%	1%	n.s.
CF x OA	n.s.	1%	1%
CF x OACF	n.s.	n.s.	n.s.
CF x CO	n.s.	1%	1%
CF x COCF	n.s.	n.s.	1%
OA x OACF	n.s.	1%	1%
OA x CO	n.s.	n.s.	1%
OA x COCF	n.s.	1%	1%
OACF x CO	n.s.	1%	1%
OACF x COCF	n.s.	n.s.	1%
CO x COCF	n.s.	1%	n.s.

5.1.4. Coágulo Sanguíneo

A tabela 9 e a figura 31 mostram os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **coágulo sanguíneo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Segundo a análise dos dados houve uma tendência à presença de maior volume de coágulo sanguíneo nos animais sob administração de cafeína quando comparados ao soro fisiológico, sendo esta diferença estatisticamente significativa a 1% tanto para o grupo controle quanto para os que foram implantados biomateriais.

Os dados representados na tabela 10 e ilustrados na figura 32 demonstram os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **coágulo sanguíneo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células tronco, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **21 dias** após a extração dental. Para este período a avaliação histométrica revela, assim como no período de 7 dias, maior quantidade de coágulos sanguíneos nos grupos tratados com cafeína, diferença esta estatisticamente significativa a 1%, mas quando a comparação é realizada com o período de anterior, a reabsorção dos coágulos mostra uma menor porcentagem no alvéolo dental.

Na tabela 11 e na figura 33 são mostrados os valores médios e erro padrão da média do volume percentual de **coágulo sanguíneo** dos grupos controle, implantação de osso autógeno e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas, em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína

ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. A quantidade de coágulos sanguíneos se mostra diminuída em relação aos períodos anteriores, mas aumentada nos animais em que a cafeína foi administrada, sendo estas diferenças estatisticamente significantes (1%) apenas no grupo controle e nos animais implantados com osso autógeno.

A análise estatística através de comparações múltiplas entre os grupos estudados nos períodos de 7, 21 e 42 dias, quanto à porcentagem volumétrica de coágulo sanguíneo foi realizada através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, levando em consideração níveis de significância de 1% e 5% (tabela 12).

Tabela 9: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de coágulo sanguíneo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **7 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). **significante a 1%.

Coágulo Sanguíneo - 7 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	11,7 ± 1,58	18,927 ± 1,88	19,717 ± 2,55
Cafeína	39,55 ± 2,03**	34,956 ± 2,68**	42,583 ± 3,78**

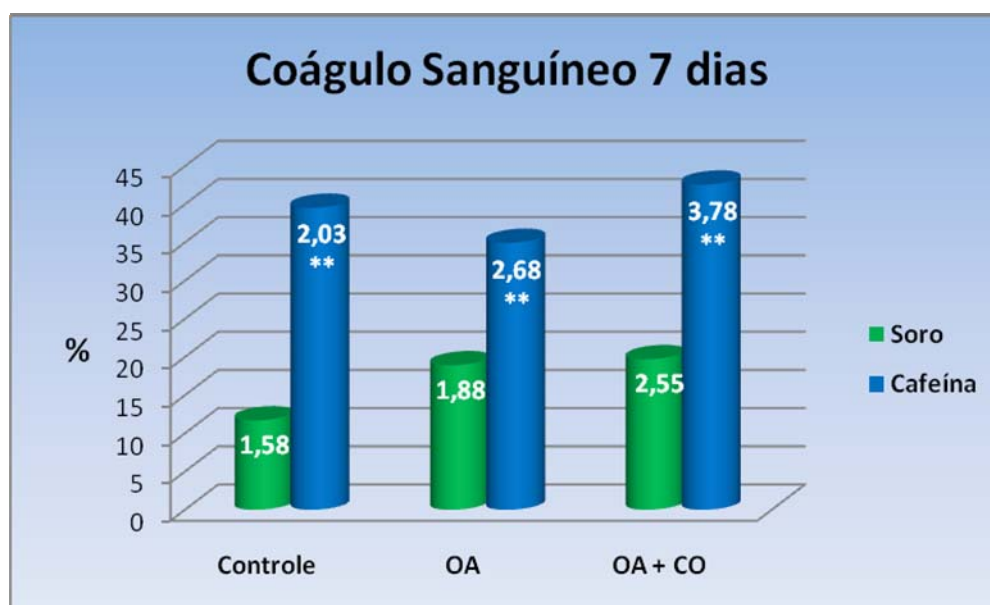


Figura 31: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de coágulo sanguíneo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **7 dias** após a extração dental. **significante a 1%.

Tabela 10: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de coágulo sanguíneo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **21 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). **significante a 1%.

Coágulo Sanguíneo - 21 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	1,49 ± 0,4	4,64 ± 1,03	1,8833 ± 0,57
Cafeína	17,24 ± 2,39**	16,747 ± 2,28**	21,787 ± 2,74**

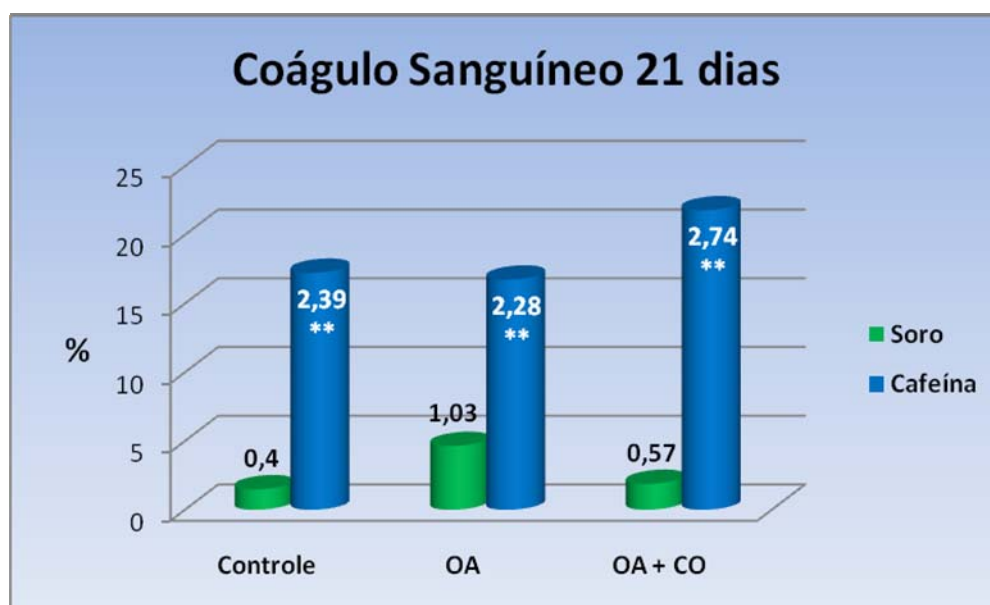


Figura 32: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de coágulo sanguíneo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **21 dias** após a extração dental. **significante a 1%.

Tabela 11: Média aritmética e erro padrão referente ao volume percentual de coágulo sanguíneo dos grupos controle, implantação de osso autógeno (OA), e implantação de osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), em animais que foram submetidos à administração diária de cafeína ou soro fisiológico, **42 dias** após a extração dental. Teste estatístico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (n=7). **significante a 1%.

Coágulo Sanguíneo - 42 dias			
	Controle	OA	OA + CO
Soro	0,00 ± 0,00	0,91 ± 0,41	0,57 ± 0,25
Cafeína	4,86 ± 1,76**	9,2 ± 1,46**	0,55 ± 0,29

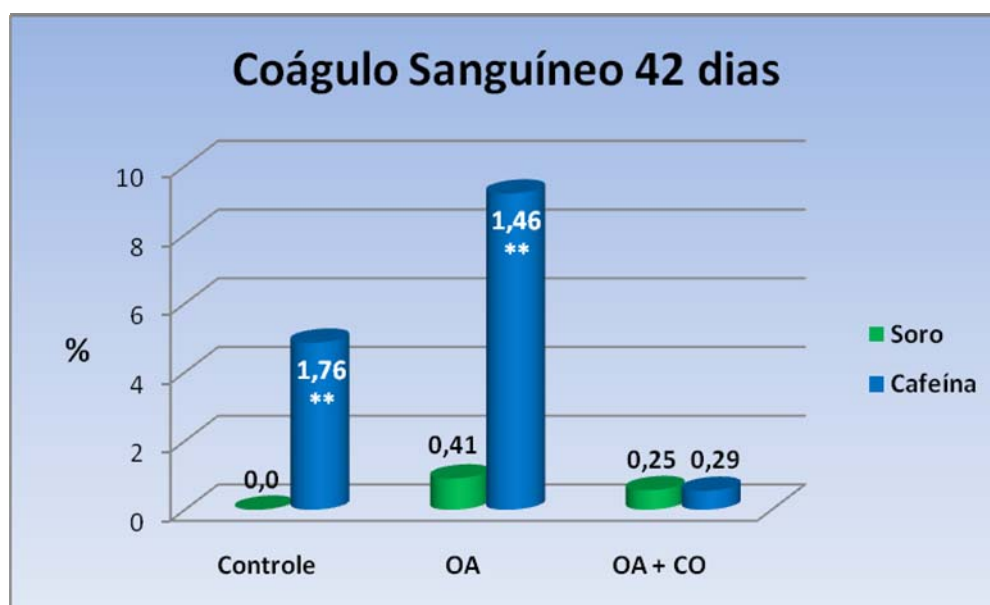
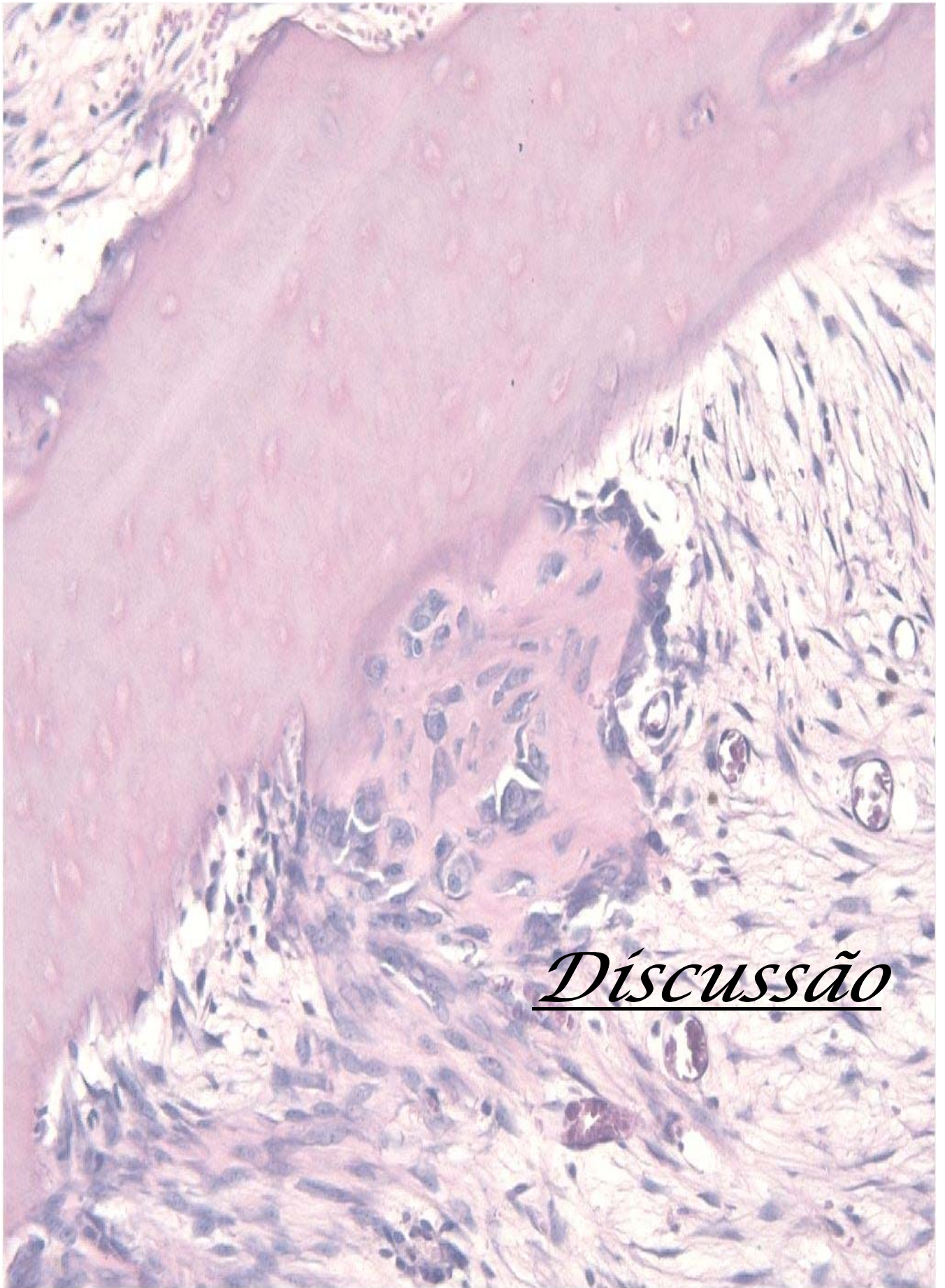


Figura 33: Média e erro padrão (dentro dos cilindros) da fração de volume (%) de coágulo sanguíneo no alvéolo total dos animais controle, implantados com osso autógeno (OA) e osso autógeno + células osteoblásticas (OA+CO), submetidos à administração de soro fisiológico e cafeína, **42 dias** após a extração dental. **significante a 1%.

Tabela 12: Comparações múltiplas entre os diversos grupos estudados através do teste estatístico Kruskal-Wallis para a porcentagem de tecido ósseo em 7, 21 e 42 dias (significância descrita na tabela). S – soro; CF – cafeína; OA – osso autógeno; CO – células osteoblásticas.

Coágulo Sanguíneo			
Grupos	7 dias	21 dias	42 dias
S x CF	1%	1%	1%
S x OA	1%	n.s.	n.s.
S x OACF	1%	1%	1%
S x CO	5%	n.s.	n.s.
S x COCF	1%	1%	n.s.
CF x OA	1%	1%	n.s.
CF x OACF	5%	n.s.	1%
CF x CO	1%	1%	5%
CF x COCF	n.s.	n.s.	5%
OA x OACF	1%	1%	1%
OA x CO	n.s.	n.s.	n.s.
OA x COCF	1%	1%	n.s.
OACF x CO	1%	1%	1%
OACF x COCF	n.s.	n.s.	1%
CO x COCF	1%	1%	n.s.



Discussão

6. Discussão

6.1. CAFEÍNA E REPARAÇÃO ÓSSEA

A reparação tecidual é um dos fenômenos mais interessantes que ocorrem nos organismos vivos. Deve-se ter em mente que este não é um processo isolado, mas faz parte de uma série complexa de eventos biológicos. A reparação dos tecidos biológicos é considerada uma fase da reação inflamatória, de vez que não pode ser separado dos fenômenos vasculares e celulares que ocorrem em resposta a uma agressão.

O processo de reparação consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é dinâmico envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. Incluem diversos processos, como coagulação, inflamação, depósito de substâncias e síntese de matriz, a angiogênese, fibroplasia, a epitelização, a retração da lesão e remodelação (MANDELBAUM, 2003).

O início da coagulação é imediato após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. A formação do coágulo serve para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como

os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias (WERNER; GROSE, 2003). O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase, permanece do terceiro ao décimo dia, fagocita bactérias, debrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. Alta atividade dos macrófagos é observada após o trauma. Os linfócitos aparecem na ferida aproximadamente em uma semana, seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a psonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias. Os mediadores mais freqüentes são: Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF); Fatores de Crescimento Transformadores (TGF- β e TGF- α); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Complementos plasma-ativados C3 e C5a (toxinas anafiláticas), eles conduzem a multiplicação das células endoteliais, produzindo novos vasos sanguíneos (angiogênese), duplicando células musculares lisas e sintetizando matriz. Muitos fatores que influem no processo de reparação tecidual são secretados pelos macrófagos, como TGFs, citocinas e interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e PDGF (MANDELBAUM, 2003; WERNER; GROSE, 2003).

Na seqüência final está a proliferação, que é o fechamento do processo com a presença do tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia e formação da matriz, que no tecido ósseo finaliza com a formação do osteóide e mineralização.

O processo de reparação de feridas de extração dental, ou processo de reparação alveolar, refere-se ao conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo, em seguida à exodontia. Tem sido estudado detalhadamente, visto que dentre os procedimentos cirúrgicos, as exodontias ocupam posição de destaque nos consultórios odontológicos (JOHANSEN, 1970).

O organismo tem como objetivo, frente a um traumatismo após a extração dental, preencher com tecido ósseo o espaço deixado no alvéolo. Este fenômeno apresenta a mesma seqüência das respostas reparativas observadas em outras regiões, com algumas particularidades locais (CARVALHO; OKAMOTO, 1987).

A cicatrização de uma ferida de extração dental, que é a ferida óssea mais comum na cavidade oral, é uma extensão única de tecido conjuntivo cicatricial, pois a formação de novo osso depende da deposição de cristais de hidroxapatita ao longo das fibras colágenas em uma matriz de proteoglicanas chamada osteóide (KURITA et al., 1985). A mineralização do alvéolo dentário se dá a partir do terço apical em direção ao cervical e das paredes alveolares para o centro (SANTOS PINTO, 1964). O epitélio da mucosa gengival prolifera sobre o coágulo organizado e/ou sobre o tecido conjuntivo jovem, na tentativa de restabelecer a continuidade da cobertura epitelial do rebordo alveolar. A reparação alveolar se completa quando o alvéolo dentário apresentar-se preenchido por trabéculas ósseas espessas e espaços medulares diminutos e a crista alveolar remodelada.

A compreensão do processo de reparação no organismo é de grande importância na busca de materiais que possam interferir favorecendo a restauração tecidual de maneira rápida e adequada.

As horas seguintes a extração dental são críticas, pois qualquer distúrbio local ou sistêmico sobre o coágulo, no sentido de desorganizá-lo, pode retardar consideravelmente a reparação alveolar. A colocação de qualquer material no interior de alvéolos dentais é encarada como um distúrbio local pelo organismo podendo, portanto, resultar em atraso, mais ou menos acentuado, na cronologia do processo de reparação. Os implantes intra-alveolares normalmente perturbam a organização do coágulo e lesam o ligamento periodontal remanescente (CARVALHO; OKAMOTO, 1978).

As análises qualitativa (histológica) e quantitativa (histométrica) ao microscópio de luz permitiram observar que os ratos submetidos à administração de cafeína tiveram um retardo na formação de tecido de granulação, em relação aos ratos que receberam soro fisiológico como tratamento. Nos animais tratados com a cafeína pôde ser constatada a permanência de uma grande quantidade de coágulo sanguíneo no alvéolo dentário até na fase mais tardia analisada (42 dias). Como conseqüência, a diferenciação em tecido ósseo também foi retardada, visto que o número de trabéculas ósseas observadas foi 41,28% menor nos animais tratados com a droga quando comparados aos que não a receberam.

Takesue (1989) já demonstrava ações deletérias da cafeína na reparação de feridas, o autor pode observar, através da microscopia eletrônica de transmissão, que esta droga levou a alterações na lâmina basal da interface epitélio-conjuntivo, em gengiva de ratos. Barger-Lux et al. (1990) demonstraram em mulheres pré-

menopausa uma diminuição no acréscimo e reabsorção do tecido ósseo bem como no turnover de cálcio sob o uso desta droga.

A reabsorção do coágulo sanguíneo pelos macrófagos é um passo crucial na substituição deste por tecido de granulação, qualquer mecanismo que interfira na atividade destas células quebra toda a cascata reparativa tecidual. Jafari e Rabbani (2000) relataram uma diminuição na viabilidade de macrófagos pulmonares utilizando doses médias de cafeína (> 20 mM), devido principalmente a uma maior produção de ânions superóxidos e fragmentação do DNA, levando grande parte da população destas células a apoptose. Em 2004 estes mesmos autores, mostraram que os efeitos deletérios da cafeína sobre estas células se dá principalmente pelo aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, visto que o aumento deste mediador intracelular leva ao desencadeamento das atividades apoptóticas (BINDER ; HIDDEMANN, 1994; HALE et al., 1996).

A cafeína tem principalmente 2 ações farmacológicas: é um antagonista dos receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) alterando a função da enzima adenil ciclase, tendo como principais efeitos o bloqueio das funções exercidas pela adenosina. O outro meio de ação é através do aumento das concentrações do mediador intracelular adenosina monofosfato cíclico (AMPC), e subsequente ativação da proteína kinase A (PKA) (ROSHENTAL et al., 1992; HARRIGAN., et al 2004; RANG; DALE, 2007).

Primeiramente, o AMPC é um potente imunomodulador, exercendo no geral efeitos supressivos nas funções das células inflamatórias e imunocompetentes (para revisão ver KAMMER, 1988). Por exemplo, a ativação do eixo AMPC/PKA inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-12, e promove a produção de IL-10 em macrófagos (PROCÓPIO et al., 1999) e em células

mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) (EIGLER et al., 1998). A expressão do RNAm de IL-4, IL-3 e de fator estimulante de colônias granulocítica-monocíticas (GM-CSF) foi menor com a ativação deste eixo (BORGER et al., 1996) bem como a secreção de IL-5 em células T humanas (STAPLES et al., 2001). O AMPc também inibiu a proliferação de linfócitos (AANDAHL et al., 2002). Deste modo, inibidores das enzimas fosfodiesterases como o rolipram e as xantinas têm extensivos efeitos na função imune, incluindo supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF- α , IL-2 e interferon- γ), estimulação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), diminuição da produção de superóxidos e, quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos (para revisão ver SOUNESS et al., 2000). Estes achados sugerem que a habilidade da cafeína poderia resultar em efeitos imunomodulatórios, uma vez que esta inibe a ação das enzimas fosfodiesterases (PDEs), cuja função é degradar o AMPc através da hidrólise em um metabólito inativo o 5'-AMP (Figura 34). O AMPc tem como principais efeitos o controle das enzimas envolvidas no metabolismo energético, da divisão e diferenciação celular e do transporte de íons (RANG; DALE, 2007).

Como mencionado anteriormente, acredita-se que a administração de cafeína exerça também os seus efeitos via antagonismo dos receptores de adenosina (Figura 34). Adenosina é um potente imunomodulador, exercendo no geral (mas não exclusivamente) efeitos supressivos no sistema imune, tais como a supressão da produção de IL-12 e o aumento de IL-10 (LINK et al., 2000). Dos 4 subtipos de receptores de adenosina, o receptor A_{2A} é considerado o mais importante em mediar as ações imunomodulatórias da adenosina (ZHANG et al., 2005; KRECKLER et al., 2006). Há algumas evidências de que a adenosina poderia ativar células imunes, e potencializar a resposta imunológica sob certas condições. Por exemplo, adenosina

promoveu quimiotaxia pela via dos receptores A_1 e A_2 (CRONSTEIN et al., 1990), no entanto a estimulação dos receptores A_3 levou a uma redução dose-dependente na quimiotaxia de eosinófilos humanos (WALKER et al., 1997). Em adição, a adenosina tem mostrado causar ativação de mastócitos em asmáticos através da via do receptor de adenosina A_{2B} (FEOKTISTOV; BIAGGIONI, 1997). Foi também reportado que a inalação de adenosina provocou aumento dos níveis de histamina, prostaglandina D2 e triptase no fluido broncoalveolar de asmáticos (POLOSA et al., 1995) indicando ativação das células mastocíticas (SCHWARTZ, 1990). Como um antagonista dos receptores de adenosina, é de se esperar que a cafeína possa alterar os efeitos da adenosina endógena na função imune.

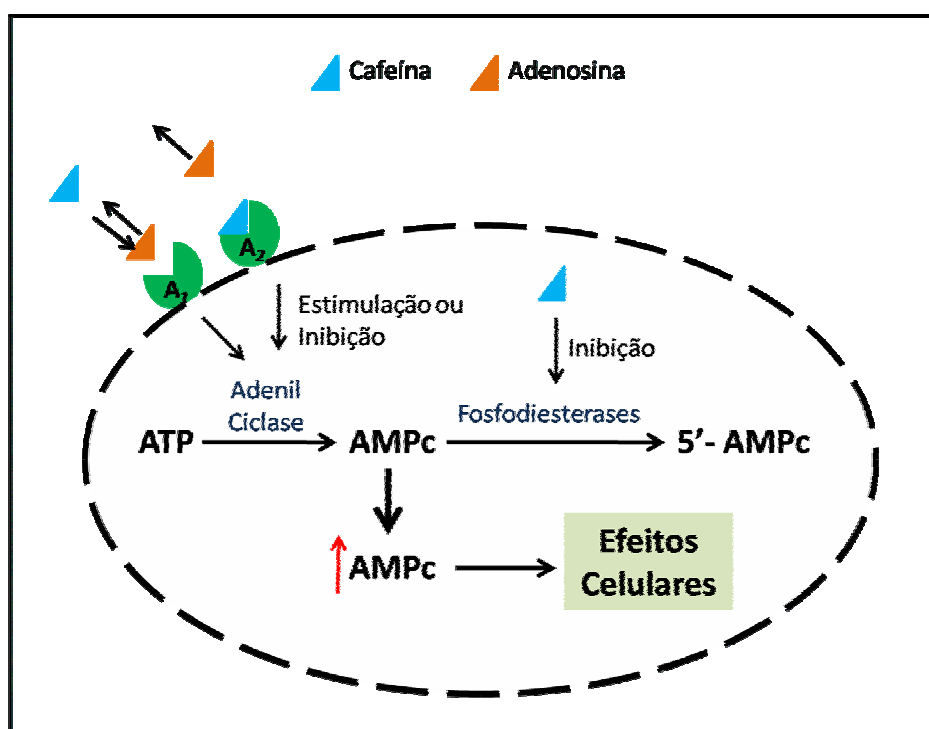


Figura 34: Efeitos intracelulares da cafeína. Inibição das enzimas fosfodiesterases e antagonismo dos receptores de adenosina, com a conseqüente elevação dos níveis do AMPc.

Vários trabalhos relatam que a cafeína pode modular vários aspectos da resposta inflamatória e da resposta imune adaptativa e inata (para revisão ver HERRIGAN; KELLY; CONNOR, 2006).

Na produção de citocinas Chavez-Valdez et al. (2008) sugere que a cafeína na concentração de 50 μ M, via bloqueio dos receptores A₁, aumenta a produção de AMPc e inibe a produção pré-transcricional de TNF- α em monócitos do cordão umbilical. Van Furth et al., em 1995, relata uma diminuição na concentração do mediador acima, *in vitro*, utilizando cafeína na dose de 200 μ g/ml sobre células sanguíneas de voluntários saudáveis. Mesmos resultados também foram publicados por Herrigan; Kelly e Connor (2004) na dose de 100 μ M. Quanto às interleucinas, menor porcentagem destas também foi encontrada para IL-10 (VAN FURTH et al., 1995), IL-2 (ROSHENTAL et al., 1992; RITTER et al., 2005), IL-4 (ROSHENTAL et al., 1992), IL-5 e e IFN- γ (HERRIGAN; KELLY; CONNOR, 2005).

Quanto à proliferação de linfócitos, efeito supressor é relatado sobre estas células tanto em ratos quanto em voluntários humanos saudáveis (ROSHENTAL et al., 1992; HERRIGAN et al., 2005), bem como sobre a produção de anticorpos (SAXENA et al., 1984; ROSHENTAL et al., 1992)

Alguns trabalhos relatam que não só a produção de citocinas, mas também a função das células inflamatórias é alterada na presença da cafeína, como a quimiotaxia, que é diminuída para neutrófilos e monócitos (HERRIGAN et al., 2003).

Os monócitos são células derivadas da medula óssea e quando estabelecidos nos diversos tecidos passam a se denominar macrófagos, estes por sua vez são células responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento que, de certa forma direcionam a regeneração e a cicatrização das feridas. Estes fatores agem em outros tipos celulares tais como fibroblastos, queratinócitos, PMNs e

células endoteliais. Também efeitos sobre os macrófagos são relatados, como a estimulação destas células através da liberação de IFN- γ pelos linfócitos T. Dentre os principais mediadores produzidos por estes derivados dos monócitos estão TGF- α , TGF- β , PDGF, EGF, FGF, IL-1, TNF e IGF-1 (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005) (*Apêndice – Tabela 13*).

Através dos trabalhos acima citados acreditamos que a grande porcentagem de coágulo sanguíneo encontrada nos alvéolos dos animais submetidos à administração de cafeína aos 7, 21 e 42 dias sendo de 39,02%, 18,59% e 4,87% comparado aos não submetidos 16,78%, 2,67% e 0,4% respectivamente, e a conseqüente menor neoformação óssea, poderia ser resultado de uma alteração na função dos macrófagos através da diminuição da sua atividade e/ou apoptose, como mostrou os trabalhos de Jafari e Rabbani em 2000 e 2004, bem como da diminuição na produção de IFN- γ pelos linfócitos T (HORRIGAN et al., 2005; RITTER et al., 2005), e conseqüentemente na queda dos efeitos estimulatórios deste mediador sobre as funções fagocitárias e secretórias.

Uma vez diminuída a viabilidade dos macrófagos no sítio reparador, muitas das citocinas estimuladoras dos fibroblastos tendem a apresentar menores níveis. Sabendo-se que vários destes fatores de crescimento agem na quimiotaxia, proliferação, produção de colágeno e formação de tecido de granulação (*Apêndice – Tabela 13*), talvez a deficiência na formação de tecido de granulação e a manutenção do coágulo possa ter ocorrido também por uma inibição das funções reparativas dos fibroblastos.

O tecido ósseo sofre remodelação contínua durante a vida através de um processo que foi descrito por Frost (1969). Em adultos, aproximadamente 25% do osso trabecular é reabsorvido e substituído todo ano (MONOLAGAS; JILKA, 1995).

Segundo Parfitt (1984), a remodelação trabecular óssea ocorre quando a reabsorção óssea é iniciada em uma superfície previamente quiescente; uma discreta unidade de osso é removida, e a lacuna resultante é preenchida imediatamente por novo osso. A fase de formação óssea é mediada por osteoblastos que substituem os osteoclastos na lacuna de reabsorção e teoricamente podem preenchê-la com menor, maior ou igual quantidade de tecido ósseo.

Na realidade, os mecanismos de ação da cafeína na remodelação óssea ainda não estão totalmente esclarecidos e podem incluir tanto ações diretas como indiretas. As ações indiretas podem ocorrer secundariamente às mudanças nos minerais críticos à homeostase óssea (cálcio e fósforo), seja através de alterações nos hormônios reguladores destes minerais ou na absorção e excreção dos mesmos (HEANEY, 2002). A evidência para ações diretas da cafeína no metabolismo da célula óssea foi principalmente obtida em estudos de cultura de células, mostrando alterações tanto nos osteoblastos quanto nos osteoclastos (WINK; ROSSOWSKA; NAKAMOTO, 1996).

No presente trabalho, foi observada através da análise histométrica uma diminuição significativa no volume percentual de tecido ósseo de 45%, 49% e 30% respectivamente nos grupos sob efeito da cafeína 7, 21 e 42 dias pós-extração em comparação aos grupos que receberam soro fisiológico. Além da persistência do coágulo no defeito ósseo, e as possíveis causas associadas a esta manutenção, problemas relativos à diferenciação, multiplicação, produção de matriz óssea e mineralização pelos osteoblastos e osteócitos poderiam estar associados ao déficit ósseo por nós encontrado.

Vários autores relataram a ação deletéria da cafeína no metabolismo ósseo. Estudos realizados em humanos, através da densitometria óssea, demonstraram

diminuição na massa óssea espinhal e de vários sítios ao longo do esqueleto em mulheres saudáveis pós-menopausa sob dieta com cafeína (HARRIS; DAWSON-HUGHES, 1994).

Rapuri et al., (2001) comparou através de um estudo longitudinal de 3 anos, a densidade mineral óssea (BMD) em 489 mulheres pós-menopausa consumindo altas ou baixas doses de cafeína na dieta. O grupo com dieta alta consumia quantidades de cafeína acima de 300 mg/dia e o grupo com baixa quantidades consumia porções menores que 300 mg/dia. Os autores observaram que doses altas foram capazes de acelerar a perda óssea na espinha destas mulheres.

Muitos dos efeitos indiretos na perda óssea em mulheres pós-menopausa poderiam ser explicados pelo fato de que a ingestão crônica de cafeína aumentaria os níveis de excreção do cálcio urinário (MASSEY; WHITING, 1993) e pela diminuição da eficiência na absorção deste mineral pelo intestino com a idade, o que poderia alterar o balanço cálcico no organismo (AVIOLI; MCDONALD; LEE, 1960; ARMBRECHT et al., 1979).

Quanto aos efeitos diretos sobre as células ósseas, Wink et al. (1996) observou em ratos sob tratamento com cafeína, que as principais alterações foram diminuição no número de osteócitos por área trabecular, vacuolização dos osteoblastos e, a análise microscópica em um maior aumento mostrou mitocôndrias intumescidas e rompidas nas células estudadas, o que proporcionou um retardo no desenvolvimento ósseo destes animais. Em cultura de células, a cafeína demonstrou em células semelhantes a osteoblastos, inibição dos eventos proliferativos quando foram utilizadas na concentração de 1 mM, e acredita-se que este efeito se deu pelo aumento do AMPc intracelular nestas, levando pequena replicação destas células no meio em que eram cultivadas (KAMAGATA-KIYOUURA et al., 1997; 1999).

A diferenciação osteoblástica é multifatorialmente modulada por uma cascata de eventos relacionados à expressão gênica. Estes eventos inicialmente se caracterizam pela proliferação, seguido pela maturação da matriz, e mineralização da matriz óssea extracelular (COELHO; FERNANDES, 2000). A expressão da fosfatase alcalina é considerada um marcador inicial da diferenciação do fenótipo osteoblástico, enquanto a formação de nódulos de mineralização representa o marcador final da diferenciação destas células (HARRIS et al., 1995).

Quanto à diferenciação dos osteoblastos e mineralização da matriz, a cafeína foi capaz de reduzir os níveis de colágeno produzido pelos osteoblastos aos 17 e 21 dias, período este que é considerado de alta atividade na formação da matriz e que precede a deposição mineral (TASSINARI et al., 1991). Assim, a formação de um adequado tecido osteóide de acordo com a cronologia reparativa óssea foi alterada pela adição da droga ao meio de cultura destas células.

Além do prejuízo relacionado à produção das proteínas colágenas da matriz extracelular, a cafeína também foi capaz de diminuir significativamente, em osteoblastos, os níveis de fosfatase alcalina intracelular aos 7 dias de cultura, e a formação de nódulos calcificados. Dados também mostraram que esta droga foi capaz de ativar de modo irreversível o caminho bioquímico da morte celular programada destas células (TSUANG et al., 2006).

6.2. OSSO AUTÓGENO E REPARAÇÃO ÓSSEA

Segundo Hench e Wilson (1984), existem duas classes de implante endósseo: com ligação óssea e sem ligação óssea. Enquanto os metais como o titânio não tem ligação, materiais com cálcio e fosfato são denominados osteo-

ligantes (DAVIES, 1998). A osteogênese associada a materiais utilizados como implante vem sendo estudada por vários autores. Os termos osteogênese à distância e osteogênese por contato foram primeiramente descritos por Osborn e Newesley (1980). Estes termos descrevem essencialmente dois fenômenos diferentes onde o osso se forma justaposto à superfície do implante: **osteogênese à distância**, onde o novo osso é formado na superfície do osso pré-existente no sítio peri-implante, culminando com o envolvimento do implante pelo tecido ósseo. O outro fenômeno é a **osteogênese por contato**, onde novo osso se forma primeiro na superfície do implante, após a colonização por uma população de células osteogênicas antes do início da formação de matriz óssea (OSBORN; NEWESLEY, 1980).

O restabelecimento do volume ósseo pode ser obtido através de diversos materiais de implante/enxerto. Segundo Ellis III (2001), o enxerto ideal deveria ter as características estruturais de um enxerto em bloco e o potencial osteogênico de um enxerto ósseo esponjoso medular em partículas, fornecendo altas concentrações de células osteogênicas.

São denominados biomateriais, aqueles materiais que são colocados em contato com sistemas biológicos e apresentam habilidade de interagir apropriadamente com o hospedeiro em uma aplicação específica (WILLIANS, 1987).

O objetivo na utilização dos biomateriais é a combinação de uma reparação rápida com capacidade de ser reabsorvido durante a remodelação óssea (LANGSTAFF et al., 2001) ou osseointegrado ao tecido.

Diversos materiais para implante, cada um com suas propriedades próprias, são utilizados na tentativa de acelerar a reparação óssea. Muitos destes materiais quando usados sozinhos apresentam efeitos limitados ou variáveis sobre a

reparação óssea e, em alguns casos com desvantagens específicas. Por esta razão, muitos clínicos e/ou pesquisadores tem combinado materiais para encontrar uma associação que apresente maior eficiência na reparação óssea (COCHRAN et al., 2003).

O osso autógeno é, ainda, a referência “gold standard” devido as suas excelentes propriedades biológicas e ao seu grande potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor (HJØRTING-HANSEN, 2002; MAZOCK et al., 2004; MINICHETTI et al., 2004; JENSEN et al., 2006).

Para um enxerto ser considerado favorável torna-se necessárias algumas características ideais que o osso autógeno apresenta como um substituto ósseo, que são: livre de transmissão de doenças, biocompatibilidade, radiopacidade, microporosidade, estimular a indução óssea, reabsorver em período comparativo ao da formação óssea, ser substituído por tecido ósseo, fácil de ser obtido e manipulado, agir como matriz ou veículo para outros materiais e ter baixo custo (GROSS, 1997).

Neste trabalho também se avaliou através da histologia e histometria a reparação óssea do defeito ósseo produzido pela extração dentária utilizando como implante/enxerto o osso autógeno isoladamente, ou associado às células tronco.

O exame histológico dos alvéolos dos animais que receberam soro fisiológico e a implantação do osso autógeno isoladamente mostrou um padrão normal de reparação, apresentando características similares aos da literatura, incluindo aqueles do nosso laboratório (BRENTGANI et al., 1996 e 1997; LAMANO-CARVALHO et al., 1997a; BOMBONATO-PRADO, 2002; CALIXTO, 2005; BALABANIAN, 2005; PRATA, 2005). A análise mostrou que o material enxertado é biocompatível, não sofreu reação de corpo estranho, e foi progressivamente

integrado ao osso alveolar no processo de reparação óssea (Figuras 19A,C ; 22A,C e 25A,C).

O osso autógeno provindo da calota craniana como material de transplante/enxerto é considerado um material com bons resultados clínicos e experimentais (MISCH, 1990; DONOVAN et al., 1994), pois segundo Ozaki e Buchman (1998) a sua origem embriológica, intramembranosa, é a mesma dos ossos da região oral e maxilofacial, o que favorece a integração do tecido ao leito receptor e a aposição de novo tecido ósseo quando comparado aos de origem endocondral.

Crespi et al. (2007) comparou em humanos os enxertos de osso autógeno tendo como origem a calvária e a crista ilíaca para elevação do assoalho do seio maxilar. 16 pacientes que necessitavam deste tipo de cirurgias foram incluídos no estudo, destes 10 receberam enxerto provindos da calota craniana e 6 da crista ilíaca, após 5 meses biópsias foram realizadas na área para análise histomorfométrica. Os resultados mostraram que, no grupo que recebeu enxerto da calota craniana o volume total de osso formado foi de 73,4% e de osso vital foi de 67,9%, enquanto no grupo que recebeu enxerto de crista ilíaca estes valores foram de 46,6% e 34,0% respectivamente. Os autores concluíram que o enxerto obtido da calota craniana (origem intramembranosa) para o procedimento de levantamento de seio maxilar apresentou significativamente maior volume ósseo total e maior volume de osso vital comparado ao enxerto ósseo da crista ilíaca (origem endocondral).

Nos períodos estudados, a análise histométrica dos alvéolos implantados com osso autógeno nos animais sob tratamento com soro fisiológico não mostrou diferenças estatisticamente significantes na porcentagem de osso neoformado quando se compara este grupo aos animais que não receberam a enxertia (Tabelas

1, 2 e 3; Figuras 27, 28 e 29), o que tem semelhança com os resultados apresentados no trabalho de Melo (2007), cuja metodologia foi parecida ao nosso, e diferenças também não foram encontradas.

Já nos animais sob tratamento com cafeína, o implante do osso da calota craniana não foi capaz de reduzir os efeitos nocivos da cafeína no processo reparacional ósseo. A porcentagem de tecido ósseo, histometricamente avaliada, quando se compara com os animais implantados e tratados com soro fisiológico, revela uma diminuição estatisticamente significativa a 1 % para os três períodos estudados (Tabelas 1, 2 e 3; Figuras 27, 28 e 29), Estes resultados provavelmente se deram pelos efeitos da cafeína na reabsorção do coágulo e na substituição do mesmo por tecido ósseo, mecanismos estes já descritos acima.

Dinato e Polido (2004), Misch (2006) descrevem com clareza o mecanismo de crescimento e reparação em um enxerto ósseo autógeno em que destaca 3 fases:

- As células transplantadas vivas, principalmente da porção esponjosa do enxerto, sobrevivem nos primeiros 3 ou 4 dias por meio da alimentação com o tecido vascular cicunjacente. Entre 5 e 7 dias inicia-se o processo de angiogênese e revascularização. Estas células viáveis vão depositar uma matriz óssea desorganizada, sem sistema de Havers ou periosteal organizado. Este osso é chamado de Fase I, está associado ao número de células transplantadas e determina a quantidade de osso que se formará além da dimensão original.

- A medida que as células transplantadas morrem, as células ósseas do tecido receptor seguem e remodelam o enxerto por meio da reabsorção do osso de Fase I, e o substituem por um osso mais organizado, com sistema periosteal e harvesiano. Este osso é conhecido como osso Fase II. Neste remodelamento, os osteoclastos reabsorvem a matriz inorgânica do enxerto original, liberando fatores de crescimento

e proteínas indutoras do crescimento e diferenciação de células osteoprogenitoras (osteoindução).

- E por ultimo a matriz inorgânica de HA, que forma uma plataforma no enxerto autógeno, contribui para o efeito osteocondutor da formação óssea à medida que o osso novo se forma por meio da substituição. Este processo pode ser considerado como uma terceira fase da formação óssea pelo osso autógeno.

Quanto à análise qualitativa do tecido enxertado e de sua periferia nos animais sob tratamento com a droga, foi observado certa reação inflamatória de corpo estranho, osteoclastos em processo reabsortivo, pobre osseointegração e pouca quantidade de tecido ósseo neoformado (Figuras 19B,D; 22B,D e 25B,D). Estes achados provavelmente se deram devido a uma alteração na cronologia do processo de crescimento e reparação do osso autógeno descrito pelos autores acima.

Acreditamos que a reação inflamatória de corpo estranho que persistiu na periferia do enxerto possa ser devido às alterações nos processos imunoinflamatórios causados pela cafeína (HORRIGAN et al., 2006) no organismo do animal e conseqüentemente no alvéolo dental.

Quanto ao tecido ósseo implantado no alvéolo acreditamos que as células transplantadas vivas já podem conter algum comprometimento devido ao uso sistêmico da droga, pois segundo Wink et al. (1996), em ratos sob tratamento com cafeína, as principais alterações encontradas foram diminuição no número de osteócitos por área trabecular e osteoblastos com mitocôndrias intumescidas e rompidas e, *in vitro* Kamagata-Kiyoura et al. (1997; 1999) mostrou inibição dos eventos proliferativos destas células. No que se refere à nutrição destas células,

este passo também pode ter sido comprometido, pois, o retardo na reabsorção do coágulo levou a um atraso no processo de angiogênese e revascularização tanto do alvéolo como um todo, como do novo tecido implantado. Portanto a deposição da matriz óssea e a formação do osso de fase I podem ter sido diminuídas por estes mecanismos.

Partindo do exposto que as células viáveis poderiam já estar comprometidas, a sua morte precoce pode ter levado ao desencadeamento do processo reabsortivo tão cedo (7 dias) (Figura 19D) realizado pelos osteoclastos no osso de fase I e persistindo em grande intensidade até por volta do 21º dia (Figura 22D). Com o objetivo de prover proteínas osteoindutoras ao meio e mais tarde um arcabouço para a formação do osso de fase II essa reabsorção é importante, mas na quantidade e na duração adequadas, a grande atividade clástica no enxerto pode também ter levado a um menor volume de arcabouço ósseo, conseqüentemente baixa capacidade osteocondutora para a remodelação e deposição de um osso maduro nos arredores do implante.

Portanto a pobre osteointegração e a pouca quantidade de osso neoformado na periferia do implante/enxerto, pode ter sido resultado da dissolução da matriz óssea pelos produtos ácidos produzidos durante a reação inflamatória de corpo estranho, pela baixa taxa de formação do osso de fase I, pela nutrição prejudicada do enxerto e pela alta atividade osteoclástica neste tecido.

6.3. CÉLULAS TRONCO E REPARAÇÃO ÓSSEA

A medicina regenerativa com o uso de células tronco tem sido uma grande saída para o tratamento de defeitos ósseos (VACANTI; BONASSAR 1999;

OHGUSHI; CAPLAN, 1999). Células tronco mesenquimais podem facilmente ser expandidas para um grande número de células (REYES et al., 2001) e quando utilizadas adequadamente podem melhorar a capacidade reparadora e cicatrizadora óssea (HERNIGOU et al., 2005; VAZ, 2006). A engenharia de tecidos tem sido proposta como uma alternativa para as tradicionais técnicas de reparação óssea (BRODIE, HUMES 2005). O princípio geral da engenharia tecidual envolve associação de células a um suporte natural ou sintético, visando à produção tridimensional de um arcabouço contendo o material celular (MARCACCI et al., 1999; KRUYT et al., 2004).

Com a intenção de aumentar o número de células precursoras osteogênicas a serem adicionadas nos alvéolos dentários, realizamos a retirada da medula óssea femoral conforme método descrito por Maniatopoulos et al. (1988), seguido pela expansão destas células osteoprogenitoras e diferenciação das mesmas em osteoblastos (ROSA; BELOTI; VAN NOORT, 2003). Com esta técnica, obtivemos uma concentração de células nucleadas osteoprogenitoras já diferenciadas em osteoblastos maior que em um centrifugado osteogênico de medula, e maior que o aspirado medular na sua forma original. Ainda por meio do teste de viabilidade celular, confirmamos que estas células permaneceram viáveis após a expansão, excluindo a possibilidade de lesão ou morte celular causado pelo método utilizado.

No que se refere à concentração das células provindas da medula óssea e sua relação com a atividade osteogênica, vários trabalhos mostram que quanto maior o número de células, maior a atividade reparativa no local. Connolly (1995) compara após a implantação na cavidade abdominal de coelhos, a capacidade osteogênica de aspirados de medula óssea isoladamente com o obtido por vários métodos de centrifugação. O objetivo da centrifugação foi promover uma maior

concentração celular/ml no material a ser implantado. Os resultados revelaram maior quantidade de tecido ósseo neoformado nas implantações feitas com o material centrifugado, comprovando assim que a osteogênese no interior das câmaras é diretamente proporcional à concentração celular da solução osteogênica. Mesmos achados feitos em humanos por Hernigou et al. (2005) que confirmaram clinicamente a importância do emprego de técnicas para aumento da concentração de células osteoprogenitoras a serem administradas localmente, no tratamento de pseudoartroses de tíbia.

Assim procuramos utilizar o maior número de osteoblastos a serem implantados no defeito ósseo alveolar, numa concentração de $3,3 \times 10^5$ células/ml, e possivelmente conseguir maior efeito osteogênico durante a cicatrização óssea, número este que tem semelhança com os trabalhos de Kasten et al. (2006), utilizando 2×10^5 células/ml e Nair et al. (2008), 5×10^5 células/ml.

Recentemente Nair et al. (2009) estudaram o uso isolado das células tronco mesenquimais expandidas e diferenciadas em laboratório e associadas ao plasma rico em plaquetas (PRP) na reconstrução de defeitos segmentares em fêmures de cabras. Os autores usaram uma biocerâmica como carreador das células, e estas foram implantadas nos defeitos. Os resultados histomorfométricos mostraram que nos animais onde a biocerâmica foi utilizada isoladamente a taxa de osso neoformado foi de 36,2% e no grupo contendo as células foi de 61,6%. Concluem os autores que a engenharia tecidual com o uso de células e também do PRP pode ser um método eficaz de tratamento, pois neste modelo foi capaz de acelerar os eventos reparativos em defeitos ósseos extensos.

Lacerda, Prata e Brentegani (em publicação no *Implant Dentistry* - 2009) compararam o uso das células tronco expandidas e diferenciadas em osteoblastos

com o osso autógeno na reparação óssea alveolar pós-extração. Os resultados histométricos revelaram que a associação CO+OA produziu aumento significativo (10% a 15%) de trabéculas ósseas nos períodos experimentais estudados comparados ao grupo controle. Concluíram que células osteoblásticas associadas ao osso autógeno aceleraram a reparação óssea.

Embora estudos tenham confirmado a superioridade da terapia com células tronco mesenquimais expandidas em culturas em relação à utilização de aspirados de medula óssea (KADIYALA; JAISWAL; BRUDER, 1997), estas culturas aumentam substancialmente custos e riscos. Complicações como contaminação com bactérias e vírus e depleção da capacidade proliferativa das células tronco mesenquimais antes da sua implantação têm sido relatadas. Além disso, a preferência pela seleção *in vitro* das células com maior potencial proliferativo pode causar a escolha de células com mutações e capazes de dar origem a tumores, como teratomas. No presente estudo, durante a análise qualitativa, não foi observado nos alvéolos a formação de massas celulares tumorais ou crescimentos que se diferenciaram da cicatrização óssea regular descrita na literatura.

Além da implantação direta nos defeitos ósseos através de pipeta, o osso autógeno serviu como um material carreador e osteocondutivo para as células, visto que há microporosidades na arquitetura deste tipo de tecido e o mesmo foi previamente mergulhado no concentrado de células antes da implantação. Bruder e Fox (1999) comentam que a matriz ideal para o crescimento e diferenciação das células tronco mesenquimais deveria permitir distribuição e retenção celular uniformes, suportar crescimento vascular e ser composta de material que fosse incorporado facilmente durante o ciclo de remodelação óssea.

Os osteoblastos utilizados nesta pesquisa foram alógenos, ou seja, tiveram como fonte doadora a medula óssea de um animal da mesma espécie dos animais onde seriam implantadas. Estudos sugerem que o uso deste tipo de transplante de células tronco mesenquimais poderia não ser rejeitado na ausência de imunossupressão, inclusive em modelos animais (BARTHOLOMEW et al., 2001; DEVINE et al., 2003).

Arinzeh et al., (2003) estudaram os efeitos do uso das células tronco alógenas na reparação óssea em defeitos críticos na diáfise femoral de cães. Os resultados mostraram que quanto à reparação óssea, houve um aumento na taxa de cicatrização e um novo osso foi capaz de preencher o defeito presente, e quanto à resposta das células alógenas frente ao organismo receptor, nenhuma resposta adversa do hospedeiro pode ser detectada durante o experimento nem anticorpos contra estas células. Os autores concluíram que as células utilizadas neste modelo puderam melhorar a capacidade reparativa óssea sem o uso de terapia imunossupressiva, e na ausência de resposta imunes adversas. Em 2008, Planka et al. estudaram em coelhos o uso de células tronco mesenquimais autógenas ou alógenas no reparo de defeitos femorais em coelhos. Puderam observar que não houve diferenças quanto à reparação do defeito entre os tipos celulares utilizados, e quanto ao transplante alógeno nenhuma rejeição foi encontrada.

Qualitativamente os alvéolos dos animais que receberam soro fisiológico e foram submetidos à implantação de osso autógeno + células tronco mostrou que esta associação era biocompatível, apresentando uma osteointegração progressiva durante o período experimental, isenta de reação de corpo estranho e nem formações tumorais (figuras 20A ; 23A,C e 26A,C). Na histometria, quantidades de tecido ósseo neoformado similares aos animais sem a implantação destes

biomateriais pode ser observado, como estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (BRENTGANI et al., 1996 e 1997; LAMANO-CARVALHO et al., 1997a; BOMBONATO-PRADO, 2002; CALIXTO, 2005; BALABANIAN, 2005; PRATA, 2005).

Quando analisamos os defeitos ósseos dos animais implantados com a associação osso autógeno/células tronco, mas sob administração diária de cafeína, observamos uma queda na neoformação óssea da ordem de 51,94%; 56,2% e 2,82% aos 7, 21 e 42 dias respectivamente (Figuras 27,28 e 29).

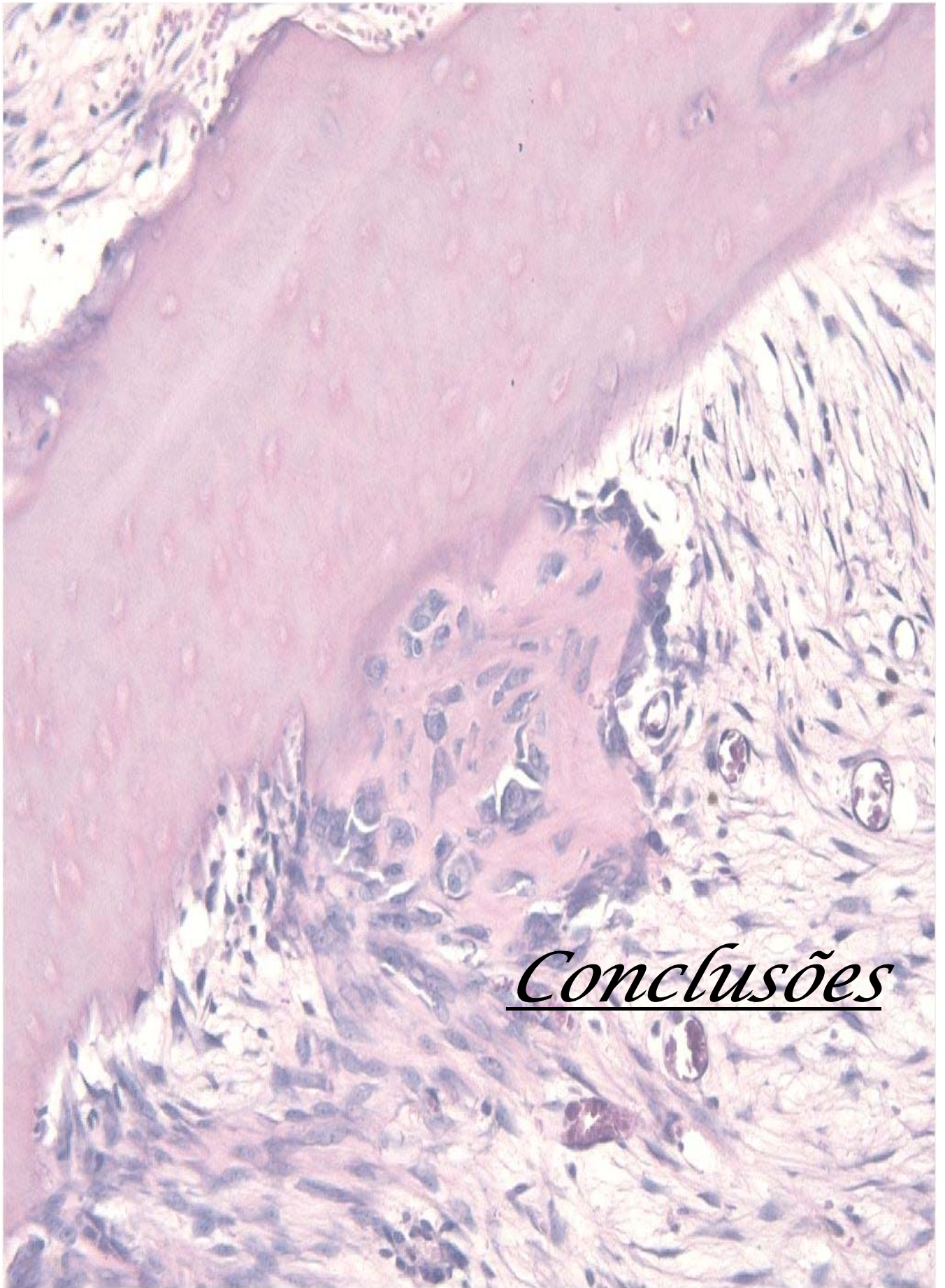
A histometria mostrou que a reparação óssea foi significativamente acelerada com esta combinação, sugerindo um efeito sinérgico entre os materiais, ou seja, enquanto o osso autógeno pode agir como osteoindutivo e/ou osteocondutivo, as células osteoblásticas pode estar estimulando células da região promovendo formação de novo osso. Esta associação pode apresentar propriedades quimiotáticas, atraindo células osteoprogenitoras e osteoblastos para a região, promovendo aceleração da reparação óssea.

A menor quantidade de osso neoformado no 7º e 21º dias provavelmente tenha ocorrido, como já discutido acima, devido a uma permanência do coágulo sanguíneo no alvéolo e a uma diminuição, nestes períodos, na capacidade proliferativa dos osteoblastos implantados, visto que são células sensíveis a presença de cafeína no meio onde estão alojadas, levando a vacuolização, rompimento de mitocôndrias (WINK et al., 1996), inibição dos eventos proliferativos (KAMAGATA-KIYOUURA et al., 1997; 1999) e apoptose destas células (TSUANG et al., 2006). Tassinari et al. (1991) relata diminuição dos níveis de colágeno produzido pelos osteoblastos aos 17 e 21 dias, período este que coincide com os dados por nós apresentados, assim esta menor porcentagem de neoformação óssea na

presença de cafeína poderia ser fruto de uma falta de fibras colágenas para se desenvolver o processo mineralizador osteóide.

No 42º dia a histometria mostrou que a neoformação óssea teve valores próximos aos dos animais que não receberam a droga, havendo uma diminuição no percentual ósseo da ordem de apenas 2,82%. Assim acreditamos que as células osteoblásticas em um período tardio foram capazes aumentar sua atividade sintetizadora e assim compensar o dano causado pela cafeína na reparação alveolar.

A expectativa é de que os resultados apresentados abram novas possibilidades de acompanhamento de outros estudos e, ao mesmo tempo, permitam o aprofundamento de questões aqui apontadas, mas não inteiramente examinadas por não constarem do escopo da proposta inicial do projeto.



Conclusões

7. Conclusões

Dos resultados apresentados pode-se concluir que:

1. Houve um atraso significativo na formação de tecido ósseo reparacional nos alvéolos dentários dos animais submetidos à administração diária de cafeína nos três períodos (7, 21 e 42 dias) estudados quando comparados aos tratados com soro fisiológico.
2. O fragmento de osso autógeno obtido da calota craniana isoladamente ou associado às células osteoblásticas implantado no terço médio do alvéolo mostrou uma osteointegração progressiva e sem reação de corpo estranho nos animais tratados com soro fisiológico.
3. As células osteoblásticas não proporcionaram o desenvolvimento de reações imunogênicas, massas teciduais tumorais e nem reação de corpo estranho quando implantadas no alvéolo dentário.
4. A associação osso autógeno/células osteoblásticas foi capaz de estimular a neoformação óssea e compensar em períodos tardios, os efeitos deletérios causados pela cafeína na reparação óssea alveolar.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing a dense arrangement of cells with prominent nuclei and some larger, rounded structures. The background is a reddish-pink color, and the foreground shows a complex, layered structure of cells and fibers. The text is overlaid on the lower right portion of the image.

Referências
Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- 1-AANDAHL, E.M.; MORETTO, W.J.; HASLETT, P.A.; VANG, T.; BRYN, T.; TASKEN, K.; et al. Inhibition of antigen-specific T cell proliferation and cytokine production by protein kinase A type 1. **J. Immunol.**, v. 169, p. 802-08, 2002.
- 2-ABUKAWA, H.; SHUN, M.; WILLIAMS, W.B.; VACANTI, J.P.; KABAN, L.B.; TROULIS, M.J. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue engineered bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 601-606, 2004.
- 3-ALBERIUS, P.; GORDH, M.; LINDBERG, L.; JOHNELL, O. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat skull. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 104, p. 554-61, 1996.
- 4-ALMEIDA, J.D.; ARISAWA, E.A.L.; ROCHA, R.F.; CARVALHO, Y.R. Effect of calcitonin on bone regeneration in male rats: a histomorphometric analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, p. 435-40, 2007.
- 5-ALONSO, N. **Estudo comparativo entre enxertos autólogos de crânio e crista ilíaca. Correlação entre dados macroscópicos e dados histológicos. Estudo experimental em coelhos.** 1992. 70 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 1992.
- 6-ALVES, M.C.R.; OKAMOTO, T. Influência do estresse no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odont. UNESP**, v. 18, p. 119-130, 1989.
- 7-ALVES-REZENDE, M. C.; OKAMOTO, T. Effect of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. **Braz. Dent. J.**, v. 8, n.1, p. 13-19, 1997.
- 8-AMLER, M.H.; JOHNSON, P.L.; SALMAN, I. Histological and histochemical investigation of alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 61, p. 32-44, 1960.
- 9-ARINZEH, T.L.; PETER, S.J.; ARCHAMBAULT, M.P.; VAN DEN BOS, C.; GORDON, S.; KRAUS, K.; SMITH, A.; KADIYALA, S. Allogenic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **J. Bone Joint. Surg. Am.**, v. 85-A, n. 10, p.1927-35, Oct 2003.

- 10-ARMBRECHT, H.J.; ZENSER, T.V.; BRUNS, M.E.; DAVIS, B.B. Effect of age on intestinal calcium absorption and adaptation to dietary calcium. **Am. J. Physiol.**, v. 236, p. 769-74, 1979.
- 11-AVIOLI, L.V.; MCDONALD, J.E.; LEE, S.W. The influence of age on the intestinal absorption of ⁴⁷-Ca absorption in post-menopausal osteoporosis. **J. Clin. Invest.**, v. 44, p. 1960-67, 1965.
- 12-BALABANIAN, C.A.C.A. **Avaliação histométrica e histológica de reparo ósseo do alvéolo dental implantado com látex natural**. 2005. 98 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2005.
- 13-BARGER-LUX, M.J.; HEANEY, R.P.; STEGMAN, M.R. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 52, p. 722-25, 1990.
- 14-BARONE, J.J.; GRICE, H.C. Seventh International Caffeine. **Workshop Food Chem. Toxicol.**, v. 32, p. 65-77, 1994.
- 15-BARONE, L.M.; TASSINARI, M.S.; BORTELL, R.; OWEN, T.A.; ZEROGIAN, J.; GAGNE, K.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine-treated rats. **J. Cell Biochem.**, v. 52, n. 2, p. 171-82, Jun 1993.
- 16-BARTHOLOMEW, A.; PATIL, S.; MACKAY, A.; NELSON, M.; BUYANER, D.; HARDY, W.; et al. Baboon Mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo. **Hum. Gene Ther.**, v. 12, n. 12, p. 1527-41, Aug 2001.
- 17-BECKER, W.; CLOKIE, C.; SENNERBY, L.; URIST, M.R.; BECKER, B.E. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 414-21, 1998.
- 18-BESENLECHNER, D.; KANTOR, M.; TANGL, S.; TEPPER, G.; ZECHNER, W.; HAAS, R.; WATZER, G. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 16, n. 2, p. 220-27, 2005.
- 19-BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G.; Bone marrow stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 2001, p. 180-92, 2001.

- 20-BINDER, C.; HIDDEMANN, W. Programmed cell death - many questions still to be answered. **Ann. Hematol.**, v. 69, p. 45-55, 1994.
- 21-BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxyapatite with and without autogenous bone in dogs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, p. 3-7, 1985.
- 22-BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 11, p. 1281-1286, 1997.
- 23-BOMBONATO-PRADO, K.F. **Efeito do alcoolismo no reparo alveolar de ratos após o implante de uma biocerâmica. Estudo qualitativo e quantitativo em microscopia de luz e eletrônica de varredura.** 2002. 109 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2002.
- 24-BOMBONATO-PRADO, K.F.; BRENTGANI, L.G.; THOMAZINI, J.A.; LACHAT, J.J.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Alcohol intake and osseointegration around implants: A histometric and scanning electron microscopy study. **Implant. Dent.**, v. 13, p. 238-44, 2004.
- 25-BORGER, P.; KAUFFMAN, H.F.; POSTMA, D.S.; WELLENGA, E. Interleukin-4 gene expression in activated human T lymphocytes is regulated by the cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling pathway. **Blood**, v. 87, p. 91-98, 1996.
- 26-BOYNE, P.J. Current developments with growth factors and bone proteins. **Dent. Implantol. Update**, v. 10, n. 4, p. 25-7, 1999.
- 27-BOYNE, P.J. **Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible.** Chicago: Quintessence, 1997.
- 28-BRENTGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Histological evaluation of the biocompatibility of a glass-ionomer cement in rat alveolus. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 137-140, 1997.
- 29-BRENTGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Immediate implantation of glass ionomer cement granules increases osteogenesis during rat alveolar wound healing. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 38, n. 3, p. 141-145, 1996.

- 30-BRODIE, J.C.; HUMES, H.D. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 3, p. 299-313, Sep 2005.
- 31-BRUDER, S.P.; FOX, B.S. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. **Clin. Orthop.**, v. 367, p. 68-83, 1999.
- 32-BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J. Cell Biochem.**, v. 64, n. 2, p. 278-94, Feb 1997.
- 33-BRUDER, S.P.; KRAUS, K.; GOLDBERG, V.M.; KADIAYLA, S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **J. Bone Joint Surg.**, v. 80A, p. 985-86, 1998.
- 34-BURCHARDT, h. Biology of bone transplantation. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 18, p. 187-96, 1987.
- 35-BURWELL, R.G. A study of homologous cancellous bone combined with autologous red marrow after transplantation to a muscular site. **J. Anat.**, v. 95, p. 613-16, 1961.
- 36-CALIXTO, R.F.E. **Estudo comparativo do reparo alveolar após implante de uma mistura de BMPs bovinas, de partículas de matriz óssea bovina orgânica e inorgânica e de um vidro bioativo na cavidade de extração dental de rato.** 2005. 97 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2005.
- 37-CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Alveolar wound healing after implantation with a pool of commercially available bovine bone morphogenetic proteins (BMPs) – A histometric study in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 1, p. 29-33, 2007.
- 38-CARINCI, F.; FARINA, A.; ZANETTI, U.; et al. Alveolar ridge augmentation: A comparative longitudinal study between calvaria and iliac crest bone graft. **J. Oral Implantol.**, v. 31, p. 39-45, 2005.
- 39-CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. **Cirurgia Bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica.** São Paulo: Médica Panamericana, 1987. 139 p.

- 40-CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Implantes intra-alveolares: considerações sobre estudos experimentais. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 32, n. 4, p. 273-79, 1978.
- 41-CARVALHO, P.S.P.; VASCONCELOS, L.W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 15, n. 4, p. 565-70, 2000.
- 42-CASTRO, F.S. **Avaliação da manutenção da dimensão de rebordo alveolar após enxerto aloplástico de composto ósseo de rícino pós-extração dental em rato, estudo radiográfico e histológico.** 2006. 76 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, USP, 2006.
- 43-CHAPMAN, M.W.; RODRIGO, J.J.; Bone grafting, bone graft substitutes and growth factors. In: CHAPMAN, M.W., **Chapman's Orthopaedic Surgery.** Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 44-CHAVEZ-VALDEZ, R.; WILLS-KARP, M.; AHLAWAT, R.; CRISTOFALO, E.A.; NATHAN, A.; GAUDA, E.B. TITLE: Caffeine modulates TNF-alpha production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors. **Pediatr. Res.**, v. 17, Sep 2008. [Epub ahead of print].
- 45-CITARDI, M.J.; FRIEDMAN, C.D. Nonvascularized autogenous bone grafts for craniofacial skeletal augmentation and replacement. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 27, n. 5, p. 891-910, Oct 1994.
- 46-COCHRAN, D.L.; JONES, A.; HEIJL, L.; MELLONIG, J.T.; SCHOOLFIELD, J.; KING, G.N. Periodontal regeneration with a combination of enamel matrix proteins and autogenous bone grafting. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 9, p. 1269-81, 2003.
- 47-COELHO, M.J.; FERNANDES, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. **Biomaterials**, v. 21, n. 11, p. 1095-102, 2000.
- 48-CONEGLIAN, P.Z.A.; **Avaliação do processo evolutivo de reparo ósseo frente ao sulfato de cálcio e à hidroxiapatita. Estudo microscópico em alvéolos dentários de ratos.** 2007. 254 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 2007.

- 49-CONLISK, A.J.; GALUSKA, D.A. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? **Prev. Med.** v. 31, p. 562-68, 2000.
- 50-CONNOLLY, J.F. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 313, p. 8-18, 1995.
- 51-COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **ROBBINS. Pathologic basis of diseases.** 6th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999.
- 52-CRESPI, R.; VINCI, R.; CAPPARÈ, P.; GHERLONE, E.; ROMANOS, G.E. Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 22, n. 4, p. 527-32, Jul-Aug 2007.
- 53-CRONSTEIN, B.N.; DAGUMA, L.; HUTCHISON, A.J.; WILLIAMS, M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 1150-57, 1990.
- 54-DA SILVA, R.A.; FAGUNDES, D.J.; SILVA, A.C.M.B.A.; SISTI, K.E.; CARVALHO, T.M.M.B.; SILVA, D.N. Effect of anti-inflammatory agents on the integration of autogenous bone graft and bovine bone devitalized matrix in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 140-48, 2008.
- 55-DAVIES, J. Mechanisms of endosseous integration. **International J. Prosthodontics**, v. 11, n. 5, p. 391-401, 1998.
- 56-DE KOK, I.J.; SUSAN J. PETER, S.J.; ARCHAMBAULT, M.; VAN DEN BOS, C.; KADIYALA, S.; AUKHIL, I.; COOPER, L.F. Investigation of allogenic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 14, p. 481-489, 2003.
- 57-DEVINE, S.M.; COBBS, C.; JENNINGS, M.; BARTHOLOMEW, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 2999-3001, Apr 2003.
- 58-DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction sockets. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 31, p. 641-45, 2002.

- 59-DIGIROLAMO, C.M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY D.G.; CLASS, R.; PROCKOP, D.J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br. J. Haematol.**, v. 107, n. 2, p. 275-8, Nov 1999.
- 60-DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese.** São Paulo: Artes Médicas, 2004. 550 p.
- 61-DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Alveolar ridge augmentation by autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 13, n. 2, p. 185-91, 2002.
- 62-DONOVAN, M.G.; DICKERSON, N.C.; HANSON, L.J.; et al. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and branemark implants: A preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 52, p. 588-94, 1994.
- 63-DONOVAN, M.G.; DICKERSON, N.C.; HELLSTEIN, M.J.W.; et al. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, p.898-103, 1993.
- 64-DRISCOLL, P.G.; JOSEPH-JR, F.; NAKAMOTO, T. Prenatal effects of maternal caffeine intake and dietary high protein on mandibular development in fetal rats. **Br. J. Nutr.**, v. 63, p. 285-92, 1990.
- 65-DUPOIRIEUX, L.; COSTES, V.; JAMMET, P.; SOUYRIS, F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 23, p. 395-8, 1994.
- 66-EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K.H.; HARTMANN, G. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF- α production. **J. Leuk. Biol.**, v. 63, p. 101-7, 1998.
- 67-ELFERINK, J.G.; DE KOSTER, B.M. Ryanodine as inhibitor of chemotactic peptide-induced chemotaxis in human neutrophils. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50, p. 975-79, 1995.
- 68-ELLIES, L.G. Altered sensation following mandibular implant surgery: a retrospective study. **J. Prosthet. Dent.**, v. 68, n. 4, p. 664-671, 1992.

- 69-ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos maxilares. In: PETERSON, L.J. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 70-FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Adenosine A2B receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 381-402, 1997.
- 71-FOCKING, M.; SCHMIEGELT, D.; TRAPP, T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 337, p. 435-39, 2005.
- 72-FRAME, J.W.; ROUT, P.G.; BROWNE, R.M. Ridge augmentation using solid and porous hydroxyapatite particles with and without autogenous bone or plaster. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 45, p. 771-77, 1987.
- 73-FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-47, Mar 1968.
- 74-FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 16, n. 3, p. 381-90, Dec 1966.
- 75-FROST, H.M. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. **Calcif. Tissue Res.**, v. 3, p. 211-37, 1969.
- 76-GARCIA, R.D.; **Estudo do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao implante de osso bovino inorgânico e de hidroxiapatita BTCP. Análise microscópica em alvéolos dentários de ratos**. 2007. 168 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 2007.
- 77-GAU, C.H.; HSIEH, Y.D.; SHEN, E.C.; LEE, S.; CHIANG, C.Y.; FU, E. Healing following tooth extraction in cyclosporine-fed rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 34, p. 782-88, 2005.
- 78-GLAJCHEN, N.; ISMAIL, F.; EPSTEIN, S.; JOWELL, P.S.; FALLON, M. The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. **Calcif. Tissue Int.** v. 43, n. 5, p. 277-80, Nov 1998.

- 79-GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. The biology of bone grafts. **Semin. Arthroplasty**, v. 4, p. 58-63, 1993.
- 80-GORDH, M.; ALBERIUS, P.; JOHNNELL, O.; LINDBERG, L.; LINDE, A. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 27, p. 67-73, 1998.
- 81-GORUSTOVICH, A.A.; STEIMETZ, T.; NIELSEN, F.H.; GUGLIELMOTTI, M.B. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. **Anat. Rec.**, v. 291, p. 441-47, 2008.
- 82-GROSS, J.S.; Bone grafting materials for dental applications: A practical guide. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 18, p. 1013-34, 1997.
- 83-GRUNDEL, R.E.; CHAPMAN, M.W.; YEE, T.; MOORE, D.C. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. **Clin. Orthop.**, v. 266, p. 244-58, 1991.
- 84-HALE, A.J.; SMITH, C.A.; SUTHER, LAND, L.C. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, p. 1-26, 1996.
- 85-HARRIS, S.A.; ENGER, R.J.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, p. 178-86, 1995.
- 86-HARRIS, S.S.; DAWSON-HUGHES, B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 60, n. 4, p. 573-8, Oct 1994.
- 87-HEANEY, R.P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. **Food Chem. Toxicol.**, v.40, p. 1263-70, 2002.
- 88-HENCH, I.I.; WILSON, J. Surface-active biomaterials. **Science**, v. 226, p. 630-36, 1984
- 89-HERNIGOU, P.; POIGNARD, A.; BEAUJEAN, F.; ROUARD, H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **J. Bone Joint. Surg. Am.**, v. 87, n. 7, p. 1430-7, 2005.

- 90-HIBI, H.; YAMADA, Y.; UEDA, M.; ENDO, Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, p. 551-55, 2006.
- 91-HJØRTING-HANSEN, E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. **Mund Kiefer Gesichtschir**, v. 6, n. 1, p. 6-14, 2002.
- 92-HOCKERS, T.; ABENSUR, D.; VALENTINI, P.; LEGRAND, R.; HAMMERIE, C.H.F. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 10, p. 487-98, 1999.
- 93-HORRIGAN LA, DIAMOND M, CONNOR TJ, KELLY JP. (2003).Caffeine inhibits monocyte and neutrophil chemotaxis at concentrations relevant to normal human consumption. **Proceedings of the International Cytokine Society Annual Meeting, Trinity College Dublin, Ireland**, v. 20, n. 24, p. 49-54, 2003.
- 94-HORRIGAN, L.A.; KELLY, J.P.; CONNOR, T.J. Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function. **Ir. J. Med. Sci.**, v. 174, n. 2 es 4, p. 26, 2005.
- 95-HORRIGAN, L.A.; KELLY, J.P.; CONNOR, T.J. Caffeine suppresses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/Protein kinase A pathway. **Int. Immunopharmacol.**, v. 4, p. 1409-17, 2004.
- 96-HORRIGAN, L.A.; KELLY, J.P.; CONNOR, T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? **Pharmacol. Therap.**, v. 111, p. 877-92, 2006.
- 97-HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S.; LIU, S.H. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: A densitometric and histomorphometric study in young wistar rats. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 293-99, 2002.
- 98-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 Impl. Res.**, v. 7, p. 579–586, 2006.
- 99-ITURRIAGA, M.T.M.; RUIZ, C.C. Maxillary sinus reconstruction with calvarium bone grafts and endosseous implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p.344-47, 2004.

- 100-JAFARI, M.; RABANI, A. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. **Toxicology**, v. 149, p. 101-8, 2000.
- 101-JAFARI, M.; RABANI, A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: Caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. **Metabolism**, v. 53, n. 6, p. 687-92, 2004.
- 102-JAFARIAN, M.; ESLAMINEJAD, M.B.; KHOJASTEH, A.; ABBAS, F.M.; DEHGHAN, M.M.; HASSANIZADEH, R.; HOUSHMAND, B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 105, p. 14-24, 2008.
- 103-JAHANGIRI, L.; DEVLIN, H.; TING, K.; NISHIMURA, I. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. **J. Prosthet. Dent.**, v. 80, n. 2, p. 224-37, Aug. 1998.
- 104-JARDINI, M.A.N.; DE MARCO, A.C.; LIMA, L.A.; Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 100, p. 666-73, 2005.
- 105-JENSEN, S.S.; BROGGINI, N.; HJØRTING-HANSEN, E.; SCHENK, R.; BUSER, D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 17, p. 237-43, 2006.
- 106-JOHANSEN, J.R. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. **Acta. Odontol. Scand.**, v.28, n. 4, p. 441-61, 1970.
- 107-KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S.P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-size segmental bone defect. **Tissue Eng.**, v. 3, p. 173-85, 1997.
- 108-KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant.**, v. 6, n. 2, p. 125-34, 1997.

- 109-KAMAGATA-KIYOUURA, Y.; OHTA, M.; CHEUK, G.; YAZDANI, M.; SALTZMAN, M.J.; NAKAMOTO, T. Combined effects of caffeine and prostaglandin E₂ on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). **J. Periodont.**, v. 70, p. 283-88, 1999.
- 110-KAMAGATA-KIYOUURA, Y.; OHTA, M.; YAZDANI, M.; NAKAMOTO, T. Effect of caffeine on osteoblast-like cells in vitro. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 236, 1997. (Abstr. 1778).
- 111-KAMMER, G.M. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. **Immunol. Today**, v. 9, n. 7-8, p. 222-9, Jul-Aug 1988.
- 112-KASTEN, P.; VOGEL, J.; LUGINBÜHL, R.; NIEMEYER, P.; WEISS, S.; SCHNEIDER, S.; KRAMER, M.; LEO, A.; RICHTER, W. Influence of Platelet-Rich Plasma on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Ectopic Bone Formation in Calcium Phosphate Ceramics. **Cells Tissues Organs**, v. 183, p. 68–79, 2006.
- 113-KHAN, S.N.; CAMMISA, F.P.JR.; SANDHU, H.S.; DIWAN, A.D.; GIRARDI, F.P.; LANE, J.N. The biology of bone grafting. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.
- 114-KIM, C.S.; CHOI, S.H.; CHO, K.S.; CHAI, J.K. WIKESJO, U.M.; KIM, C.K. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral-derived biomaterial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 583-89, 2005.
- 115-KIYOKAWA, K.; TANAKA, S.; INOUE, Y. A new regenerative approach to oromandibular reconstruction after the resection of head and neck malignant tumors. **J. Craniofac. Surg.**, v. 13, p. 337-346, 2002.
- 116-KRECKLER, L.M.; WAN, T.C.; GE, Z.D.; AUCHAMPACH, J.A. Adenosine inhibits TNF- α release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B, but not A3 adenosine receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2006. (Epub ahead of print).
- 117-KRUYT, M.C.; VAN GAALEN, S.M.; ONER, F.C.; VERBOUT, A.J.; DE BRUIJN, J.D.; DHERT, W.J. Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1463-73, Apr 2004.

- 118-KRZYMANSKI , G.; KALEZAK , M.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. The use of bone-marrow derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 26, p. 55-60, 1997.
- 119-KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Tecido de renovação e reparações: Regeneração, cicatrização e fibrose. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 91-124.
- 120-KURITA, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKEI, T.; KAWAI, T.; HAYAKWA, T. Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. **J. Dent. Res.**, v. 64, n. 1, p. 28-32, 1985.
- 121-LAMANO-CARVALHO, T.L.; BRENTGANI, L.G.; BOMBONATO, K.F. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz. Dent. J.**, v. 8, p. 9-12, 1997a.
- 122-LAMANO-CARVALHO, T.L.; TEÓFILO, J.M.; ARAÚJO, C.A.C.A.; BRENTGANI, L.G. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of *Ricinus communis* polyurethane resin: histometric analysis in rats. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 37, p. 449-52, 1997b.
- 123-LANGSTAFF, S.; SAYER, M.; SMITH, T.J.N.; PUGH, S.M. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. **Biomaterials**, v. 22, p. 135-50, 2001.
- 124-LEVIN, M.P.; GETTER, L.; CUTRIGHT, D.E. A comparison of iliac marrow and biodegradable ceramic in periodontal defects. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 9, n. 2, p. 183-95, 1975.
- 125-LI, Z.; LI, Z.B. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **ANZ J. Surg.**, v. 75, p. 1017–21, 2005.
- 126-LIN, H. The self-renewing mechanism of stem cells in the germ line. **Curr. Op. Cell Biol.**, v. 10, p. 687-93, 1998.
- 127-LIN, W.L.; MCCULLOUGH, C.A.G.; CHO, M.I. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anat. Rec.**, v. 240, p. 492-506, 1994.

- 128-LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P.; **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1013 p.
- 129-LINDHOLM, T.S.; NILSON, O.S.; LINDHOLM, T.C. Extraeskeletal and intraeskeletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. **Clin. Orthop.**, V. 171, p. 251-55, 1982.
- 130-LINDHOLM, T.S.; RAGNI, P.; LINDHOLM, T.C. Response of bone marrow stromal cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits. **Clin. Orthop.**, V. 230, p. 296-302, 1988.
- 131-LINK, A. A.; KINO, T.; WORTH, J.A.; MCGUIRE, J.L.; CRANE, J.L.; CHROUSOS, G.P.; et al. Ligand-activation of the adenosine A2A receptors inhibit IL-12 production by human monocytes. **J. Immunol.**, v. 164, p. 436-42, 2000.
- 132-LLOYD, T.; ROLLINGS, N.; EGGI, D.F.; KIESELHORST, K.; CHINCHILLI, V.M. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 65, p. 1826-1830, 1997.
- 133-LUIZE, D.S.; BOSCO, A.F.; BONFANTE, S.; ALMEIDA, J.M. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 23, p. 207-14, 2008.
- 134-MAGALHÃES, A.E.O.; OKAMOTO, T.; BARROSO, J.S. Influência da fratura da crista óssea alveolar no processo de reparo de feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 36, n. 2, p. 203-12, 1982.
- 135-MANDELBAUM, S.H. **An. Bras. Dermatol.** v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- 136-MANIATOPOLOUS, C.; SODEK, J.; MEKCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adults. **Cell Tissue Res.**, v. 254, p. 317-30, 1988.
- 137-MANSO, M.C.; LANG, R.D. Enxerto ósseo retro-molar "onlay" para restauração ideal do contorno do rebordo alveolar. **Rev. Bras. Implant.**, v. 5, n. 5, p. 7-14, 1997.
- 138-MARCACCI, M.; KON, E.; MOUKHACHEV, V.; LAVROUKOV, A.; KUTEPOV, S.; QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng.**, v. 13, n. 5, p. 947-55, May 2007.

- 139-MAREI, M.K.; NOUH, S.R.; SAAD, M.M.; ISMAIL, N.S. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. **Tissue Eng.**, v. 11, n. 5/6, p. 751-67, 2005.
- 140-MASSEY, L.K.; WHITING, S.J. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. **J. Nutr.**, v. 123, n. 9, p. 1611-1614, 1993.
- 141-MAZOCK, J.B.; SCHOW, S.R.; TRIPLETT, R.G.; Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.** v. 19, n. 4, p. 586-93, 2004.
- 142-MELO, A. **Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos wistar preenchido com osso autógeno particulado após exodontia.** 2007. 116 f. Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2007.
- 143-MERKX, M.; MALTHA, J.C.; FREIHOFER, H.P.M.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Incorporation of three types of bone block grafts in the facial skeleton. **Biomaterials**, v. 20, p. 639-45, 1999a.
- 144-MINICHETTI, J.C.; D'AMORE, J.C.; HONG, A.Y.J.; CLEVELAND, D.B. Human histological analysis of mineralized bone allograft (puros) placement before implant surgery. **J. Oral Implantol.**, v. 30, n. 2, p. 74-82, 2004.
- 145-MISCH, C.E. Density of bone: Effect on treatment plans, surgical approach, healing and progressive loading. **Int. J. Oral Implants**, v. 62, p. 23-31, 1990.
- 146-MISCH, C.E. **Implantes Dentários Contemporâneos.** 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2006. 685 p.
- 147-MONOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Mechanisms of disease. Bone marrow, cytokines and bone remodeling- emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **New England J. Med.**, v. 332, p. 305-11, 1995.
- 148-MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ. J. Surg.**, v. 71, p. 354-61, 2001.
- 149-MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, v. 24, p. 143, 1945.

- 150-MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B.; BARRY, F.P. Stem cell therapy in a caprine model osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 12, p. 3464-74, Dec 2003.
- 151-MUSCLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitor: Practical concepts for clinical applications. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 395, p. 66-80, 2002.
- 152-MUSCLER, G.F.; MIDURA, R.J.; NAKAMOTO, C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. **J. Biomed. Biothechnol.**, v. 2003, n. 3, p. 170-93, 2003.
- 153-NAIR, M.B.; BABU, S.S.; VARMA, H.K.; JOHN, A. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. **Acta Biomater.**, v. 4, p. 173-81, 2008.
- 154-NAIR, M.B.; VARMA, H.K.; MENON, K.V.; SHENOY, S.J.; JOHN, A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. **Acta Biomater.**, v. 5, N. 5, p. 1742-55, Jun 2009. Epub 2009 Jan 21.
- 155-NISHIBORI, M.; BETTS, N.J.; SALAMA, H.; LISTGARTEN, M.A. Short-term healing of autogenous and allogenic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 10, p. 958- 66, 1994.
- 156-OHGUSHI, H.; CAPLAN, A.I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 48, n. 6, p. 913-27, 1999.
- 157-OKAMOTO, T.; ALVES-REZENDE, M.C.R.; CLÁUDIO, C.C.; RODRIGUES, T.S.; OKAMOTO, R. Effects of tissucol and epsilon aminocaproic acid in the healing process following dental extraction in dehydrated rats. **Braz. Oral Res.**, v. 20, n. 1, p. 33-9, 2006.
- 158-OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R.; ALVES REZENDE, M.C.; GABRIELLI, M.F. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.
- 159-OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, v. 2, n. 2, p. 153-62, 1973.

- 160-OREFFO, R.O.; TRIFFITT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, v. 25, p. 5-9, 1999.
- 161-ORR, T.E.; VILLARS, P.A.; MITCHELL, S.L.; HSU, H.P.; SPECTOR, M. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 22, p. 1953-59, 2001.
- 162-ORSINI, M.; ORSINI, G.; BENLLOCH, D.; ARANDA, J.J.; LAZARO, P.; SANZ, M.; DE LUCA, M.; PIATELLI, A. Comparison of calcium sulfate and autogenous bone graft to bioabsorbable membrane plus autogenous bone graft in the treatment of intrabony periodontal defects: a splint-mouth study. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 3, p. 296-302, 2001.
- 163-OSBORN, J.F.; NEWESLEY, H. Dynamic aspects of the implant bone interface. In: HEIMKE, G. (ed). **Dental Implants-Materials and Systems**. Munich: Carl Hanser, 1980. p. 111-23.
- 164-OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal stem cells: Marrow derived osteogenic precursors. **Ciba Found. Symp.**, v. 136, p. 42-60, 1988.
- 165-OWEN, M.; Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. **Bone Miner. Res.**, v. 3, p. 1-25, 1985.
- 166-OZAKI, W.; BUCHMAN, S.R. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 102, n. 2, p. 291-9, 1998.
- 167-PALECKIS, L.G.P.; **Reparação inicial de enxertos ósseos autógenos em blocos ou em partículas: estudo microscópico em cães**. 2004. 121 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004.
- 168-PALEY, D. Percutaneous bone marrow grafting on fractures and bone defects and experimental study in rabbits. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 208, p. 300-12, 1988.
- 169-PARFITT, A.M. The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in the light of recent advances in the cell biology of bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 36, p. 37-45, 1984.

- 170-PEER, L.A. The fate of autogenous human bone grafts. **Brit. J. Plast. Surg.**, v. 3, p. 233-43, 1951.
- 171-PEREIRA, M.C.; ZECCHIN, K.G.; CAMPAGNOLI, E.B.; JORGE, J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, p. 2248-53, 2007.
- 172-PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 2, 1999.
- 173-PLANKA, L.; GAL, P.; KECOVA, H.; KLIMA, J.; HLUCILOVA, J.; FILOVA, E.; AMLER, E.; KRUPA, P.; KREN, L.; SRNEC, R.; URBANOVA, L.; LORENZOVA, J.; NECAS, A. Allogeneic and autogenous transplantations of MSCs in treatment of the physal bone bridge in rabbits. **BMC Biotechnol.**, v. 8, p. 70-79, Sep 2008.
- 174-POLOSA, R.; NG, W.H.; CRIMI, N.; VANCERI, C.; HOLGATE, S.T.; et al. Release of mast cell-derived mediators after endobronchial adenosine challenge in asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, p. 624-29, 1995.
- 175-PRATA, C.A. **Reparação óssea alveolar após implante de uma combinação de proteínas derivadas da matriz de esmalte e osso autógeno. Estudo histométrico.** 2005. 98 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, 2005.
- 176-PRATA, C.A.; LACERDA, S.A.; BRENTGANI, L.G.; Autogenous bone graft associated with enamel matrix proteins in bone repair. **Implant Dent.**, v. 16, p. 413-420, 2007.
- 177-PROCÓPIO, D.O.; TEIXEIRA, M.M.; CAMARGO, M.M.; TRAVASSOS, L.R.; FERGUSON, M.A.J.; ALMEIDA, I.C.; et al. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF- α and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, p. 1195-205, 1999.
- 178-RANG, H.P.; DALE, M.M.; et al. **Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.
- 179-RAPURI, P.B.; GALLAGHER, J.C.; KINYAMU, H.K.; RYSCHON, K.L. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 694-700, 2001.

- 180-RAPURI, P.B.; GALLAGHER, J.C.; NAWAZ, Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)₂D₃ stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 103, p. 368–371, 2007.
- 181-REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2615–25, 2001.
- 182-RITTER, M.; HOHENBERGER, K.; ALTER, P.; HERZUM, M.; TEBBE, J.; MAISCH, M. Caffeine inhibits cytokine expression in lymphocytes. **Cytokine**, v. 30, p. 177-81, 2005.
- 183-ROSA, A.L.; BELOTI, M.M.; VAN NOORT, R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. **Dental Materials**, v.9 n.8, p. 768-772, 2003.
- 184-ROSA, A.L.; BRENTGANI, L.G.; GRANDINI, S.A. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate implants in dental alveolus of rats: a histometric study. **Braz. Dent. J.**, v. 6, p. 103-9, 1994.
- 185-ROSENTHAL, L.A.; TAUB, D.D.; MOORS, M.A. Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B cells. **Immunopharmacology**, v. 24, p. 203-17, 1992.
- 186-SAKAMOTO, W.; NISHIHARA, J.; FUJIE, K.; IIZUKA, T.; HANDA, H.; OZAKI, M.; et al. Effect of coffee consumption on bone metabolism. **Bone**, v. 28, n. 3, p. 332-6, 2001.
- 187-SALAMA, R.; WEISSMAN, S.L.; The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. **J. Bone Joint Surg.**, v. 60, n. 1, p. 111-5, 1978.
- 188-SALATA, L.A.; RASMUSSEN, L.; KAHNBERG, K.E. Effects of a mechanical barrier on the integration of cortical onlay bone grafts placed simultaneously with endosseous implant. **Clin. Implant Dent. Relat. Res.**, v. 4, p. 60-68, 2002.
- 189-SALVATO, G.; AGLIARDI, E. Calvarial bone grafts in severe maxillary atrophy: Preprosthetic surgery with sedation. **Implant Dent.**, v. 16, n. 4, p. 356-61, 2007.

- 190-SANADA, J.T.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 11, n. 3, p. 209-215, 2003.
- 191-SANTOS-PINTO, R. **Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dental em cães. Estudo histológico, radiográfico e microscópio.** 1964. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
- 192-SASAHARA, H.; CHEUK, S.L.; WINK, C.S.; HASHIMOTO, K.; ROSSOWSKA, M.J.; NAKAMOTO, T. Alteration of femoral structure in later life by chronically feeding caffeine during rapid growing period in newborn female rats. **Toxicol. Lett.**, V. 73, P. 55-64, 1994.
- 193-SAXENA, A.K.; SINGH, K.P.; SRIVASTAVA, S.N.; KHANNA, S.; SHUKLA, L.J.; SHANKER, R. Immunomodulating effects of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in rodents. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 22, p. 298-301, 1984.
- 194-SCHWARTZ, L.B. Tryptase, a mediator of human mast cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 86, p. 594-98, 1990.
- 195-SHOJI, K.; OHTSUKA-ISOYA, M.; HORIUCHI, H.; SHINODA, H. Bone mineral density of alveolar bone in rats during pregnancy and lactation. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1073-78, 2000.
- 196-SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento.** São Paulo: Mc Graw-Hill; 1975.
- 197-SILVA, R.V.; BERTRAN, C.A.; KAWACHI, E.Y.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 2, p. 281-86, mar 2007.
- 198-SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. **J. Craniofac. Surg.**, v. 17, n. 2, p. 297-301, mar 2006.
- 199-SILVA, R.V.; CAMILLI, J.A.; BERTRAN, C.A.; MOREIRA, N.H. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 34, n. 2, p. 178-84, 2005.

- 200-SOUNESS, J.E.; ALDOUS, D.; SARGENT, C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) inhibitors. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 127-162, 2000.
- 201-SRISUBUT, S.; TEERAKAPONG, A.; VATTRAPHODES, T.; TAWEECHASUPAPONG. Effect of local delivery of alendronato on bone formation in bioactive glass grafting in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 104, p. 11-16, 2007.
- 202-STAPLES, K. J.; BERGMANN, M.; TOMITA, K.; HOUSLAY, M.D.; MCPHEE, I.; BARNES, P.J.; et al. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the AMP dependent protein kinase A. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2074-80, 2001.
- 203-STEVENSON, S.; EMERY, S.E.; GOLDBERG, V.M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 323, p. 66-74, 1996.
- 204-SUGIYAMA, K.; HE, P.; WADA, S.; SAEKI, S. Teas and other beverages suppress D-galactosamine-induced liver injury in rats. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1361-67, 1999.
- 205-SUH, H.; HAN, D.W.; PARK, J.C.; LEE, D.H.; LEE, W.S.; HAN, C.D. A bone replaceable artificial bone substitute: Osteoinduction by combining with bone inducing agent. **Artif. Organs**, v. 25, p. 459-66, 2001.
- 206-SY, I.P. Alveolar ridge preservation using a bioactive glass particulate graft in extraction site defects. **Gen. Dent.**, v. 50, n. 1, p. 66-68, 2002.
- 207-TADJOEDIN, E.S.; DE LANGE, G.L. LYARUU, D.M.; KUIPER, L.; BURGER E.H. High concentration of bioactive glass material (BioGram) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. Histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 3, p. 428-36, 2002.
- 208-TAKESUE, M. Effect of caffeine or NaCl on wound healing of the rat gingiva. Light and electron microscopic studies. **Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi.** v. 27, n. 1, p. 277-316, Mar 1989.
- 209-TASSINARI, M.S.; GERSTENFELD, L.C.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, v. 6, n. 10, p. 1029-36, 1991.

- 210-TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipina on bone healing after tooth extraction. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, p. 375-79, 2001.
- 211-TRIPLETT, R.G.; SCHOW, S.R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 54, n. 4, p. 486-94, 1996.
- 212-TSUANG, Y.H.; SUN, J.S.; CHEN, L.T.; SUN, S.C.K.; CHEN, S.C. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. **J. Orthop. Surg.**, v. 7, p. 1-7, 2006.
- 213-URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893-9, 1965.
- 214-URIST, M.R.; MIKULSKI, A.; LIETZE, A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 4, p. 1828-32, 1979.
- 215-VACANTI, C.A.; BONASSAR, L.J. An overview of tissue engineered bone. **Clin. Orthop.**, p. 375-81, 1999. Supplement 367.
- 216-VAN FURTH, A.M.; SEIJMONSBERGEN, E.M.; LANGERMANS, J.A.M.; VAN DER MEIDE, P.; VAN FURTH, R. Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on Streptococcus pneumoniae-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β and IL-10 by human leukocytes. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, p. 689-92, 1995.
- 217-VAZ, C.E.S.; **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fraturas: estudo experimental em coelhos.** 2006. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, USP, 2006.
- 218-WADA, T.; WU, C.H.; SUGITA, H.; SUGITA, N.; KATAGIRI, S.; SHIMIZU, M.; HARA, K. Autogenous, allogenic, and β -TCP grafts: comparative effectiveness in experimental bone furcation defects in dogs. **J. Oral Implantol.**, v. 15, n. 4, p. 231-36, 1989.
- 219-WALKER, B.A.; JACOBSEN, M.A.; KNIGHT, D.A.; SALVATORE, C.A.; WEIR, T.; ZHOU, D.; et al. Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 16, p. 531-37, 1997.

- 220-WANG, Y.; UEMURA, T.; DONG, J.; KOJIMA, H.; TANAKA, J.; TATEISHI, T. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. **Tissue Eng.**, v. 9, p. 1205-1214, 2003.
- 221-WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 835-70, 2003.
- 222-WIENTROUB, S.; GOODWIN, D.; KHERMOSH, O.; SALAMA, R. The clinical use of autologous marrow to improve osteogenic potential of grafts in pediatric orthopedics. **J. Pediatric Orthop.**, v. 9, p. 186-90, 1989.
- 223-WILLIAMS, D.F.; Definitions in Biocompatibility. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, p. 3-5, 1986. In: CHESTER, V.K. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 4, Elsevier Science Publishers, London, 1987.
- 224-WILTFANG, J.; KLOSS, F.R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZEMOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.;SCHLEGEL, K.A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 187-93, 2004.
- 225-WINK, C.S.; ROSSOWSKA, M.J.; NAKAMOTO, T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. **Anat. Rec.**, v. 246, n. 1, p. 30-8, 1996.
- 226-WOZNEY, J.M. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 6, p. 506-10, Jun 1995.
- 227-WU, Z.; LIU, C.; ZANG, G. The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 37, p. 170-76, 2008.
- 228-YAMADA, Y.; UEDA, M.; NAIKI, T.; TAKAHASHI, M.; HATA, K.I.; NAGASAKA, T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 5/6, p.955-64, 2004.
- 229-YOO, J.U.; JOHNSTONE, B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 355 (supl), p. 73-81, 1998.

- 230-YOSHIKAWA, T.; OHGUSHI, H.; ICHIJIMA, K.; TAKAKURA, Y. Bone regeneration by grafting of culture human bone. **Tissue Eng.**, v. 10, n. 5-6, p. 688-98, May-Jun 2004.
- 231-ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A Nova Fronteira da Medicina.** São Paulo: Editora Ateneu, 2006. 245 p.
- 232-ZERBO, I.R.; BRONCKERS, A.L.; DE LANGE, G.L.; VANBUK, G.J.; BURGER, E.H. Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. **Clin. Oral Implant. Res.**, v. 12, n. 4, p. 379-384, 2001.
- 233-ZHANG, J.G.; HEPBURN, L.; CRUZ, G.; BORMAN, R.A.; CLARK, K.L. The role of adenosine A2A and A2B receptors in the regulation of TNF- α production by human monocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 883-89, 2005.
- 234-ZIJDERVELD, S.A.; ZERBO, I.R.; VAN DEN BERGH, J.P.A.; SCHULTEN, E.A.J.M.; TEN BRUGGENKATE, C.M. Maxillary sinus floor augmentation using a β -tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 20, p. 432-40, 2005.

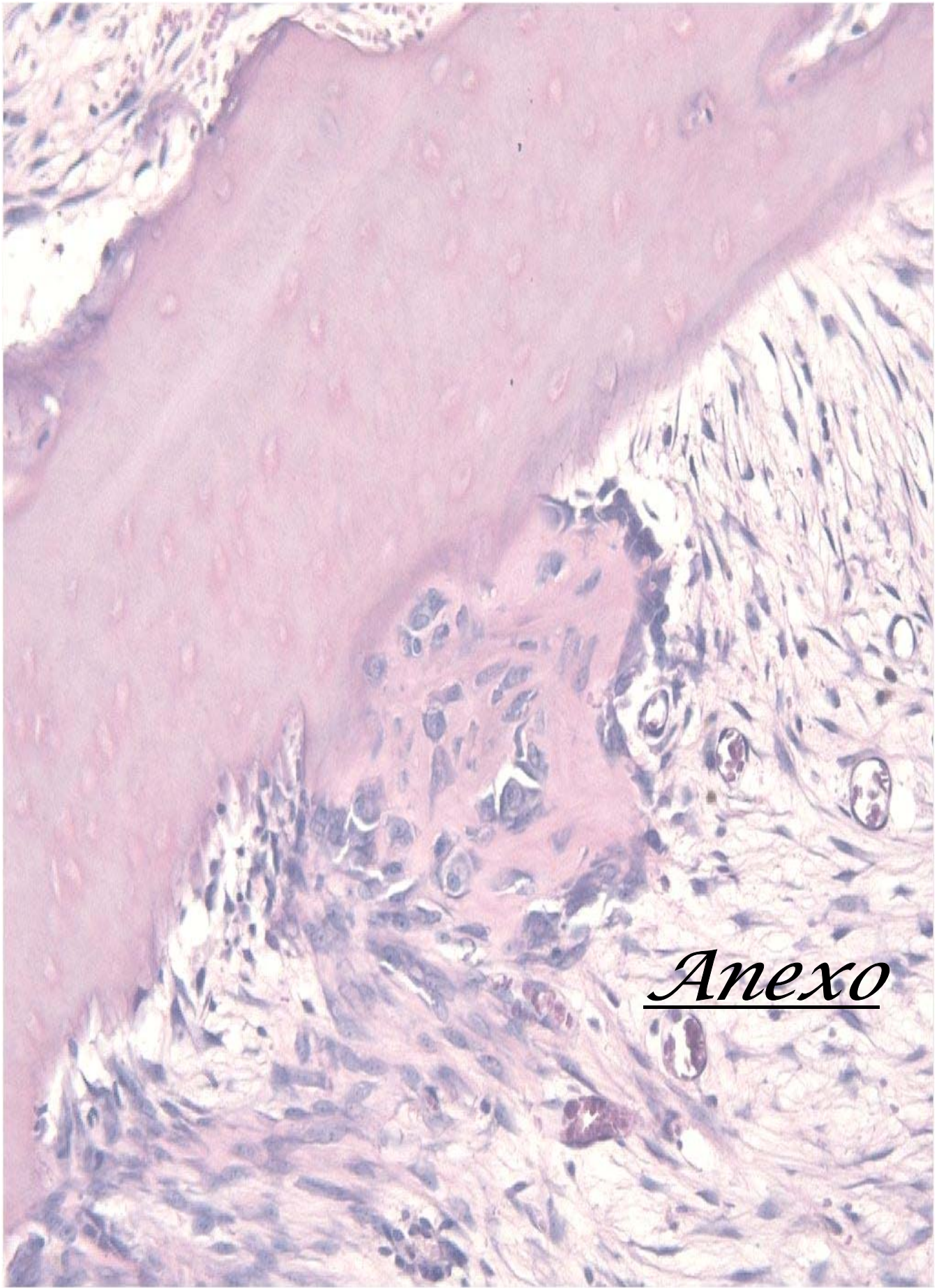


Apêndice

9. Apêndice

Tabela 13: Fatores de crescimento e citocinas envolvidos na regeneração e cicatrização de ferida. (Retirado de KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Citocina	Símbolo	Fonte	Funções
Fator de crescimento epidérmico	EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Plaquetas • Macrófagos • Saliva • Urina • Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mitogênicos aos queratinócitos e fibroblastos ✓ Estimula a migração de queratinócitos e formação de tecido de granulação
Fator transformador de crescimento alfa	TGF- α	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Linfócitos-T • Queratinócitos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Similar ao EGF
Fator transformador de crescimento beta	TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Linfócitos-T • Queratinócitos • Plaquetas • Células endoteliais • Células musculares lisas • Fibroblastos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quimiotáticos aos PMNs, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células musculares lisas ✓ Migração do queratinócito, angiogênese e fibroplasia ✓ Induz a produção de TGF-β
Fator de crescimento derivado das plaquetas	PDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Plaquetas • Macrófagos • Células endoteliais • Células musculares lisas • Queratinócitos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quimiotáticos aos PMNs, macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas ✓ Ativa os PMNs, macrófagos e fibroblastos ✓ Mitogênico aos fibroblastos, às células endoteliais e células musculares lisas ✓ Estimula a angiogênese e a contração da ferida ✓ Inibe agregação plaquetária.
Fator de crescimento de fibroblasto	FGF	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Mastócitos, linfócitos-T • Células endoteliais • Fibroblastos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quimiotáticos aos fibroblastos ✓ Mitogênico aos fibroblastos e queratinócitos ✓ Estimula a migração do queratinócito, angiogênese, contração da ferida e deposição da matriz
Interleucinas	IL-1 etc.	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Mastócitos • Linfócitos • Queratinócitos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quimiotático aos PMNs (IL-1) e fibroblastos (IL-4) ✓ Angiogênese (IL-8)
Fator de Necrose tumoral	TNF	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Mastócitos • Linfócitos T 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ativa os macrófagos ✓ Regula outras citocinas
Fator de Crescimento semelhante à insulina-1	IGF-1	<ul style="list-style-type: none"> • Macrófagos • Fibroblastos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estimula a síntese de proteoglicanos sulfatados, colágeno, migração do queratinócito e proliferação de fibroblastos ✓ Efeitos endócrinos semelhantes ao hormônio do crescimento
Interferons	IFN	<ul style="list-style-type: none"> • Linfócitos • Fibroblastos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ativa os macrófagos ✓ Inibe a proliferação de fibroblastos e síntese de MMPs



Anexo

10. Anexo

Parecer do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 07.1.276.53.5), intitulado: "Quantificação do Potencial Osteogênico do Osso Autógeno + Células Tronco Implantados em Defeito Ósseo no Rato Tratado com Cafeína", de autoria de **Luiz Guilherme Brentegani**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.04.07.

Ribeirão Preto, 4 de abril de 2007


Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos


Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

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](#)