

Fernanda Vieira Ribeiro

Avaliação da regeneração óssea em defeitos peri-implantares de deiscência tratados com uma abordagem combinada associando células derivadas da medula óssea e regeneração óssea guiada. Estudo histomorfométrico em cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica - Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

PIRACICABA

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8^a. / 6159

R354a

Ribeiro, Fernanda Vieira.

Avaliação da regeneração óssea em defeitos peri-implantares de deiscência tratados com uma abordagem combinada associando células derivadas da medula óssea e regeneração óssea guiada. Estudo histomorfométrico em cães. / Fernanda Vieira Ribeiro. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Márcio Zaffalon Casati, Karina Gonzales Silvério Ruiz.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Implantes dentários. I. Casati, Márcio Zaffalon. II. Ruiz, Karina Gonzales Silvério. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation of bone regeneration in dehiscence type peri-implant defects treated with a combined approach using bone marrow-derived cells and guided bone regeneration. A histomorphometrical study in dogs

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental implants

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Márcio Zaffalon Casati, Poliana Mendes Duarte, Joni Augusto Cirelli, Francisco Humberto Nociti Junior, Enilson Antonio Sallum

Data da Defesa: 09-12-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 09 de Dezembro de 2009, considerou a candidata FERNANDA VIEIRA RIBEIRO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Casati", written over a horizontal line.

Prof. Dr. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "J. Cirelli", written over a horizontal line.

Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Poliana Mendes Duarte", written over a horizontal line.

Prof. Dra. POLIANA MENDES DUARTE

A large, stylized handwritten signature in blue ink, appearing to be "Francisco Humberto Nociti Júnior", written over a horizontal line.

Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Enilson Antonio Sallum", written over a horizontal line.

Prof. Dr. ENILSON ANTONIO SALLUM

Dedicatória

A **Deus**, por estar presente ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Que meu caminho seja sempre traçado segundo a Tua vontade.

Aos meus pais, **Vani e Toni**, pelo amor infinito e pelo carinho sem limites. Devo a vocês tudo que sou e todas as minhas conquistas. A vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, **Renata e Ricardo**, pelo amor inexplicável que nos une, pela amizade e por tudo que vivemos juntos. Agradeço a Deus por ter me dado vocês como irmãos.

Ao **Gustavo**, por todo amor, carinho, compreensão, ajuda e paciência, sempre. Agradeço-lhe por ser meu caminho e por tornar minha vida mais feliz e completa.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pela preciosa contribuição na minha formação de graduação e pós-graduação, por todas as oportunidades, pela sua confiança em mim e pela sua amizade. Admiro-o imensamente como pessoa, orientador e profissional e agradeço-lhe e por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr**, por toda sua ajuda desde quando eu era aluna de iniciação científica até o presente momento, especialmente para a execução deste trabalho, o qual não existiria sem você. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, atenção e disponibilidade de sempre. Tenho muita gratidão e admiração por você.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, pelas oportunidades concedidas durante o curso de pós-graduação e pela valiosa contribuição na minha formação. Agradeço-lhe imensamente pelo carinho, pela agradável convivência, pelas conversas e pelo apoio sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum**, pelo carinho, confiança e por todas as oportunidades que me proporcionou, as quais foram muito importantes para mim. Obrigada por tudo, sempre.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pelo exemplo de serenidade e amizade em meio à vida profissional.

À **Eliete Aparecida Ferreira Lima**, secretária do Departamento de Prótese e Periodontia, pela amizade e pela ajuda inesgotável.

À **Regina Caetano da Silva**, secretária da área de Periodontia, pela competência, pelos auxílios e pela sua doçura de sempre.

À **Mariana Piovezan Fugolin**, técnica do laboratório de Periodontia, pela grande ajuda durante toda minha vida de graduação e pós-graduação e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

A todos que auxiliaram de alguma forma na execução deste trabalho: as veterinárias **Telma Paparotto** e **Rita de Cássia Mader** e os amigos **Marcelo Carvalho**, **Cristiane Salmon**, **Thaisângela Rodrigues**, **Karina Ruiz** e **Fabricia Suaid**. Este trabalho só foi concretizado em função da participação de todos vocês. Agradeço especialmente à **Karina**, que foi fundamental no delineamento e na execução dos experimentos, pela sua enorme ajuda, pela sua amizade e por ser um grande exemplo de profissional e pessoa. À **Thaisângela**, pela sua disponibilidade de sempre, pela grande contribuição nos experimentos, pela sua amizade e doçura. À **Fabricia**, pela nossa intensa convivência no biotério, pela força, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo companheirismo do início ao fim deste estudo.

Aos membros da banca de qualificação, **Karina Gonzalez Silverio Ruiz**, **Luciana Asprino** e **Marcelo Rocha Marques**, pela preciosa contribuição na avaliação deste trabalho.

Aos meus avós, **Nelsa**, **João**, **Lourdes** e **Antônio** (*in memoriam*), que sempre torceram por mim e se alegraram com minhas conquistas. Amo muito vocês! A todos os meus tios e primos, por toda força, torcida e apoio.

À família Pinheiro, em especial ao Seu **Thércio** e Dona **Lúcia**, **Gabriela** e **Carol**, por serem minha segunda família e por todo amor, consideração e carinho existentes entre nós. Vocês são muito importantes em minha vida!

Ao **Renato Casarin**, meu eterno amigo e irmão. Por toda ajuda durante todos estes anos e principalmente por todos os momentos de alegria, pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelos nossos sonhos e conquistas juntos.

Aos amigos do doutorado **Beatriz Bezerra, Daniela Feitosa, Fabrícia Suaid, Liana Linhares, Mauro Santamaria, Renato Casarin, Thaisângela Rodrigues, Wagner Filho e Ezymar Cayana**, por tudo que aprendemos e convivemos juntos, pelas horas de alegria e de trabalho compartilhadas. Aos demais amigos da Periodontia com quem também tive a oportunidade de conviver, **Ana Paula Giorgetti, Tatiana Meulman, Fernanda Velasco, Mônica Corrêa, Mirela Lindoso, Lucas Moura, Lucas Queirós, Hugo Valle, Maria Fernanda Peres e Maria Alice Gatti**. A todos os amigos da Periodontia que já concluíram sua etapa na pós-graduação, mas que também fizeram parte dos meus dias e que me ajudaram muito, especialmente ao **Bruno Gurgel**, pela sua amizade e por ter despertado em mim o interesse pela pós-graduação; à **Érica Ribeiro, Sandro Bittencourt, Daiane Peruzzo, João César-Neto, Ângela Martins e Patrícia Furtado**, amigos pelos quais tenho muita consideração; à **Suzana Pimentel**, pela confiança e carinho, à **Poliana Duarte**, pela amizade, pelo seu apoio e pelas oportunidades.

A todos os meus amigos da graduação que moram no meu coração, sempre.

Às minhas eternas companheiras de morada, **Aline Mie, Giovana Lécio, Thalita Oliveira, Vanessa Salvadego e Carolina Steiner**, grandes amigas que Deus colocou em meu caminho e que tanto amo. Às amigas de longa data, **Andréa Soares, Carolina Guadagnoli e Thaís Gopfert**, que compreenderam minhas ausências e que sempre me mostraram que o tempo e a distância não influenciam em uma grande amizade.

A todas as pessoas que fizeram parte de minha vida e a todos aqueles que conheci neste período.

Meus sinceros agradecimentos...

Agradecimentos

Ao Excelentíssimo Senhor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e Diretor Associado, Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, coordenador do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Mário Zaffalon Casati, chefe do Departamento de Prótese e Periodontia.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, responsável pela área de Periodontia.

Ao Prof. Dr. Pedro Rosalen, responsável pelo Biotério da FOP/UNICAMP.

Ao Sr. Wanderley e Fábio, funcionários do Biotério, pelos cuidados dispensados aos animais.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro fornecido para a realização deste trabalho.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar histometricamente o reparo ósseo em defeitos peri-implantares do tipo deiscência, criados cirurgicamente em cães, tratados com a associação de células derivadas da medula óssea (CMs) e regeneração óssea guiada (ROG). A medula óssea foi obtida a partir da crista ilíaca de oito cães beagle adultos machos. Células derivadas da medula óssea (CMs) foram isoladas, cultivadas *in vitro* e fenotipicamente caracterizadas com relação às suas propriedades osteogênicas. Os mesmos animais foram submetidos à extração bilateral dos primeiros molares e terceiro e quarto pré-molares inferiores. Após três meses, três leitões para a colocação de implantes foram confeccionados em cada lado da mandíbula, deiscências ósseas vestibulares foram criadas e, então, implantes de titânio de superfície usinada foram colocados. As deiscências ósseas foram tratadas aleatoriamente, de acordo com um dos seguintes grupos: 1) ROG+CMs+C: membrana de PTFE-e com reforço de titânio associada às células derivadas da medula óssea semeadas no carreador, 2) ROG+C: membrana de PTFE-e com reforço de titânio associada ao uso do carreador sem células, 3) CMs+C: células derivadas da medula semeadas no carreador, 4) ROG: membrana de PTFE-e com reforço de titânio, 5) C: carreador sem células e 6) Controle: nenhum tratamento. Após três meses, os animais foram sacrificados e os implantes em conjunto com os tecidos adjacentes foram processados laboratorialmente para obtenção de seções não descalcificadas. Os parâmetros avaliados foram: Contato direto osso-implante (CO), Preenchimento ósseo dentro das roscas do implante (PR) e Área de tecido ósseo fora das roscas (AF). *In vitro*, a caracterização fenotípica demonstrou que células derivadas da medula óssea apresentaram potencial osteogênico identificado pela formação de nódulos minerais e expressão de marcadores ósseos (fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I). As análises histométricas revelaram que todos os defeitos tratados com membrana (ROG+CMs+C, ROG+C e ROG) demonstraram resultados estatisticamente similares ($p>0,05$) com relação à área de novo osso formado fora das roscas do implante, apresentando, no entanto, maior quantidade de osso neoformado fora dos limites das roscas, quando comparados aos demais grupos (CMs+C, C e Controle) ($p<0,05$). Adicionalmente, foi observado que o preenchimento ósseo dentro das roscas foi estatisticamente semelhante entre os grupos que utilizaram membrana (ROG+CMs+C, ROG+C, ROG) e o grupo tratado com células sem barreira (CMs+C) ($p>0,05$), enquanto todos estes grupos mostraram um preenchimento ósseo significativamente superior ao grupo Controle ($p<0,05$). Com

relação à porcentagem de contato osso-implante, embora os defeitos tratados com membrana (ROG+CMs+C, ROG+C e ROG) tenham apresentado valores estatisticamente maiores quando comparados aos defeitos dos grupos C e Controle ($p<0,05$), uma tendência para aumento da extensão de contato osso-implante foi observada nos defeitos tratados com células sem a associação da ROG (grupo CMs+C). Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que embora as células derivadas da medula óssea, utilizadas isoladamente, tenham promovido bons resultados em relação à formação óssea dentro das roscas do implante, o seu uso, associado à ROG, não promoveu benefícios adicionais na formação óssea em defeitos peri-implantares de deiscência.

Palavras-chave: Implante dentário, Defeito peri-implantar, Regeneração óssea guiada, Células derivadas de medula óssea.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to histometrically evaluate the bone healing in surgically created dehiscence-type defects around titanium implants treated with an association of bone marrow-derived cells (BMCs) and guided bone regeneration (GBR). Bone marrow cells were harvested from eight male adult beagle dogs, cultured *in vitro* and phenotypically characterized with regard to their osteogenic properties. Following, the same animals were subjected to bilaterally teeth extraction (lower premolars and the first molar) and three months later, three implant sites were drilled in each side of mandible, buccal bone dehiscences were created and titanium dental implants with machined surface were placed. Dehiscences were randomly assigned to one of the following groups: 1) GBR+BMCs+C: PTFE-e barrier placement associated with BMCs into the carrier, 2) GBR+C: PTFE-e barrier placement associated with carrier, 3) GBR: PTFE-e barrier placement, 4) BMCs+C: BMCs into the carrier, 5) C: carrier without cells e 6) Control: no treatment. After 3 months, the animals were sacrificed and the implants in conjunction with adjacent hard tissues were processed for undecalcified sections. Bone-to-implant contact (BIC), bone filling within the limits of implant threads (BF) and new bone area (BA) in a zone lateral to the implant surface were obtained.

Results: *In vitro*, phenotypic characterization demonstrated that BMCs presented osteogenic potential identified by the mineral nodule formation and the expression of bone markers. Histometrically, inter-group analysis demonstrated that all defects treated with GBR (GBR+BMCs+C, GBR+C and GBR) were statistically similar in terms of BA ($p>0.05$), presenting significantly higher BA as compared with other groups (BMCs+C, C and Control) ($p<0.05$). With respect the BF, no differences were observed among GBR+BMCs+C, GBR+C, GBR and BMCs+C groups ($p>0.05$), whereas all these groups showed statistically superior BF as compared to Control group ($p<0.05$). Additionally, although the percentage of BIC has been significantly higher in the defects treated by barrier membrane (GBR+BMCs+C, GBR+C and GBR) as compared to C and Control groups ($p<0.05$), a trend towards to a greater extension of BIC has been observed for the defects treated with BMCs+C. Within the limits of this study, it was concluded that although the use of bone marrow-derived cells has provided promising outcomes in terms of bone formation within the limits of implant threads, their use, in combination with GBR, has not promoted additional benefits on the bone regeneration in peri-implantar dehiscence type bone defects.

Key words: Dental implants, Peri-implant defect, Guided bone regeneration, Bone marrow-derived cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Defeitos ósseos peri-implantares	3
2.2 Regeneração óssea guiada	4
2.3 Células mesenquimais derivadas da medula óssea	6
2.4 Engenharia tecidual baseada no transplante de células derivadas da medula óssea	7
3. PROPOSIÇÃO.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Animais	11
4.2 Isolamento e cultura das células derivadas da medula óssea	11
4.3 Caracterização fenotípica	13
4.3.1 Ensaio de mineralização	14
4.3.2 Análise da expressão gênica	14
4.3.2.1 Extração do RNA total.....	14
4.3.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) e RT-PCR.....	15
4.4 Análise em microscopia eletrônica de varredura	16
4.5 Procedimentos cirúrgicos.....	16
4.5.1 Exodontias	16
4.5.2 Criação dos defeitos ósseos de deiscência e colocação dos implantes	19
4.5.3 Tratamento dos defeitos ósseos	20
4.6 Sacrifício dos animais	23

4.7 Processamento Histológico	23
4.8 Análise Histométrica	24
4.9 Análise Estatística	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Caracterização <i>in vitro</i> das células derivadas da medula óssea	26
5.2 Observações clínicas	28
5.3 Análise Histométrica	28
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO	45

11 - INTRODUÇÃO

A técnica da regeneração óssea guiada (ROG) baseia-se na utilização de uma barreira física para a manutenção do espaço necessário à neoformação óssea em defeitos do tecido ósseo, prevenindo a migração de células indesejáveis de outros tecidos na região a ser reparada e protegendo o coágulo dentro do defeito (Dahlin *et al.*, 1989; Zitzmann *et al.*, 2001). Estudos mostraram que a técnica de ROG pode ser considerada uma opção para o tratamento de defeitos ósseos adjacentes a implantes dentais (Simion *et al.*, 2001; Casati *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002a, 2002b; Lima *et al.*, 2003; de Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Gurgel *et al.*, 2008). No entanto, embora resultados satisfatórios tenham sido demonstrados com a utilização de membranas, sua aplicação tem apresentado limitações para regenerar, de maneira previsível, o tecido ósseo, quando defeitos peri-implantares estão presentes (Caplanis *et al.*, 1997; Schliephake *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2003; Botticelli *et al.*, 2004a,b; Wikesjö *et al.*, 2003; 2004; Chiapasco & Zaniboni, 2009).

Desta forma, novas abordagens terapêuticas regenerativas envolvendo terapia celular têm sido estudadas para a regeneração óssea ao redor de implantes, por meio da utilização do transplante de células autógenas de origem mesenquimal com potencial para formar tecido ósseo (Yamada *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Neste contexto, a medula óssea tem sido descrita como uma fonte celular importante para a engenharia tecidual baseada no uso de células (Fibbe, 2002; Kawaguchi *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado o potencial terapêutico das células derivadas da medula óssea (CMs) e sua habilidade na regeneração do tecido ósseo em defeitos de tamanho crítico em ossos longos, na regeneração periodontal, em procedimentos de elevação de seio maxilar e em defeitos peri-implantares (Bruder *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2005; Pieri *et al.*, 2008). Adicionalmente, a possibilidade de extensa expansão das CMs *in vitro*, a facilidade de obtenção da medula óssea e a ausência de riscos imunogênicos decorrentes do auto-transplante celular (Li *et al.*, 2009) sugerem que a utilização desta abordagem terapêutica pode ser relevante para a engenharia tecidual aplicada à implantodontia.

Considerando as evidências que mostraram o potencial osteogênico das células derivadas da medula óssea e tendo em vista os aspectos positivos da ROG, tais como habilidade na manutenção do espaço e proteção da região do defeito a ser regenerado, o objetivo deste estudo foi avaliar histometricamente o reparo ósseo em defeitos de deiscência ao redor de implantes tratados

com a associação de células autógenas derivadas da medula óssea e a técnica de regeneração óssea guiada.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Defeitos ósseos peri-implantares

A reabilitação de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados com implantes dentais tem se tornado uma modalidade terapêutica de rotina nas últimas décadas, apresentando bons resultados em longo prazo (Lindquist *et al.*, 1997; Naert *et al.*, 2000). Porém, condições locais desfavoráveis, tais como insuficiente volume de tecido ósseo, podem ocasionar complicações como exposição da superfície do implante e comprometimento da sobrevivência dos implantes dentais, podendo promover resultados insatisfatórios do ponto de vista funcional e estético ou ainda, inviabilizar a utilização dos implantes dentais (Jovanovic, 1994; Esposito *et al.*, 1998; Chiapasco & Zaniboni, 2009). Mesmo na presença de uma espessura óssea satisfatória, a necessidade de se trabalhar em uma situação ótima com relação ao posicionamento do implante, na busca da estética e da função ideal, pode ocasionar a formação de defeitos ósseos peri-implantares horizontais, como deiscências ou fenestrações ósseas, os quais propiciarão exposição de parte do corpo do implante, podendo prejudicar o sucesso desta terapia (Jovanovic *et al.*, 1992; Hammerle & Jung, 2003).

Mellonig & Nevins (1995) relataram que os defeitos ósseos tipo deiscência e fenestração são os mais comuns associados aos implantes dentais. A resolução desses defeitos ósseos peri-implantares, tanto previamente ou no momento da colocação do implante, é importante para o sucesso deste tipo de tratamento reabilitador (Zablotsky *et al.*, 1991). Além da busca por uma maior sobrevida do implante, a resolução de defeitos ósseos peri-implantares tipo deiscência e fenestração é importante também do ponto de vista estético, uma vez que a manutenção dos defeitos pode ocasionar comprometimento da estética pela evidenciação das roscas do implante, tanto devido à translucidez da mucosa, como pela recessão dos tecidos moles peri-implantares, expondo a superfície do implante ao meio bucal (Chiapasco & Zaniboni, 2009).

Embora diversas terapias ósseas regenerativas tenham sido propostas para o tratamento de defeitos peri-implantares, uma das técnicas mais empregadas é a regeneração óssea guiada, com a utilização de membranas (Hämmerle & Karring, 1998; Chiapasco & Zaniboni, 2009).

2.2 - Regeneração óssea guiada

O princípio biológico da regeneração tecidual guiada, o qual visa à regeneração periodontal (formação de novo cemento, novo osso e novo ligamento periodontal), foi proposto a partir dos postulados de Melcher (1976), que estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal.

A técnica da regeneração óssea guiada tem, por sua vez, o objetivo de promover aumento do volume ósseo em áreas com deficiência deste tecido (Hämmerle & Karring, 1998), por meio da utilização de uma barreira física que previne a presença de células não osteogênicas, derivadas do tecido conjuntivo da mucosa alveolar e do epitélio, permitindo o estabelecimento de células osteogênicas derivadas do espaço ósseo medular, as quais repovoam a região do defeito, possibilitando a regeneração do tecido ósseo (Dahlin *et al.*, 1989; Becker *et al.* 1990). Esta técnica pode ser empregada no momento da colocação do implante ou em um momento cirúrgico anteriormente a este procedimento, dependendo da situação clínica e do tipo de defeito (Hammerle & Jung, 2003).

O princípio da regeneração óssea guiada aplicada ao redor de implantes dentais foi proposto inicialmente por Dahlin *et al.* (1989) e, posteriormente, demonstrado por Zablotsky *et al.* (1991). Estudos mostraram que esta técnica pode ser eficiente no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares, dentre eles, defeitos de deiscência e fenestrações (Dahlin *et al.*, 1989; Becker *et al.*, 1990; Zablotsky *et al.*, 1991; Mellonig & Nevins, 1995; Buser *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que o tecido ósseo neoformado obtido com a utilização desta técnica responde da mesma maneira que o osso pré-existente à colocação de implantes (Simion *et al.*, 2001; Rocchietta *et al.*, 2008), mesmo após o carregamento protético (Buser *et al.*, 1995).

Zablotsky *et al.* (1991) demonstraram em cães que defeitos ósseos peri-implantares tipo deiscência tratados por meio da utilização de membranas apresentaram maior preenchimento ósseo que defeitos controle, que não receberam tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Jovanovic *et al.* (1995), os quais demonstraram que membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), especialmente as com reforço de titânio, foram capazes de criar e manter o espaço necessário ao redor dos implantes dentais para a regeneração óssea neste tipo de defeito.

Em um estudo clínico, Jovanovic *et al.* (1992) trataram deiscências peri-implantares por meio da técnica da ROG e notaram, no momento da reentrada cirúrgica, após o período de seis

meses, significativo preenchimento ósseo na área do defeito, porém com grande variabilidade na resposta obtida entre os implantes avaliados. Resultados semelhantes também foram encontrados por Dahlin *et al.* (1995), os quais avaliaram a eficácia da técnica de regeneração óssea guiada em um estudo clínico multicêntrico. Foram tratadas 40 deiscências e 15 fenestrações ósseas detectadas no momento da colocação dos implantes dentais. Após dois anos de acompanhamento, os autores observaram uma redução significativa na altura dos defeitos peri-implantares.

Lima *et al.* (2003) descreveram, em um estudo em cães, o padrão de reparo ósseo peri-implantar em defeitos circunferenciais tratados com membranas. Os resultados demonstraram que, quando as membranas permaneceram em posição, houve um preenchimento significativo do defeito ao redor dos implantes, mas salientaram que a necessidade de remoção precoce das barreiras, em função de exposição das mesmas, pode afetar negativamente a regeneração óssea peri-implantar.

Além do risco de deiscências de tecido mole, ocasionando exposição prematura da membrana, possível contaminação e prejuízo da resposta ao tratamento regenerativo (Mellonig & Nevins, 1995; Buser *et al.*, 1999), outras complicações têm sido relacionadas à utilização de barreiras. Neste contexto, um problema técnico encontrado quando defeitos ósseos ao redor de implantes dentais são tratados com a técnica da ROG está associado ao fato de muitos tipos destes defeitos não estabelecem um espaço naturalmente, favorecendo o deslocamento da membrana durante o período de cicatrização e o seu colapso, reduzindo, deste modo, a previsibilidade desta técnica. Desta forma, tem sido sugerido o uso de outros materiais ou modalidades regenerativas para serem aplicadas em conjunto à utilização das membranas (Stentz *et al.*, 1997; Hammerle *et al.*, 1998). O uso combinado de barreira e enxerto ósseo desmineralizado, seco e congelado, no tratamento de defeitos ósseos peri-implantares circunferenciais, foi avaliado em cães por Stentz *et al.* (1997). Os resultados mostraram uma quantidade significativamente maior de preenchimento do defeito ósseo e de contato osso-implante em defeitos tratados pela associação de membranas e enxerto ósseo quando comparados a defeitos tratados pela membrana isoladamente. Hammerle *et al.* (1998) investigaram o papel desta associação em defeitos de deiscência criados cirurgicamente em macacos. Os autores observaram uma superioridade em termos de ganho ósseo e contato osso-implante para os grupos que utilizaram a associação entre os materiais ou que aplicaram a membrana isoladamente, quando comparados ao grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo ou ao grupo controle, sem tratamento.

Recentemente, Chiapasco & Zaniboni (2009), por meio de uma revisão sistemática, analisaram os resultados clínicos referentes ao reparo peri-implantar após a utilização da técnica da ROG para correção de defeitos de deiscência e fenestração presentes no momento da colocação de implantes dentais. Foram selecionados, na revisão sistemática, estudos que tivessem avaliado clinicamente os resultados da utilização de barreira, associada ou não ao uso de enxertos ósseos ou outros materiais, em termos de complicação dos procedimentos associados à ROG, taxa de sobrevivência dos implantes e estabilidade dos tecidos marginais peri-implantares. Os pacientes foram acompanhados por 1 a 10 anos após o carregamento protético. Embora tenha sido relatada exposição da barreira em alguns casos, a taxa de sobrevivência dos implantes foi de 95,7% e não foram observadas alterações na profundidade de sondagem e/ou no nível de inserção clínico ao redor dos implantes durante o período de acompanhamento. Apesar dos resultados obtidos serem favoráveis, os autores mencionaram não ser ainda possível estabelecer conclusões definitivas quanto à melhor abordagem a ser empregada no tratamento de deiscências e fenestrações peri-implantares, uma vez que foi observada grande variabilidade nos resultados entre os materiais de enxerto e os tipos de membrana utilizados, e ainda quanto à utilização da técnica da ROG sozinha ou em associação com outros materiais. Adicionalmente, devido à falta de estudos clínicos controlados na literatura, os autores relataram ser inviável, até o presente momento, estabelecer qual abordagem terapêutica avaliada permitiria maiores taxas de sobrevivência de implantes em longo prazo.

2.3 – Células mesenquimais derivadas da medula óssea

Considera-se como célula-tronco um tipo celular especial que difere de outras células do organismo por apresentar as seguintes características: são células indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular (Barry & Murphy, 2004).

Dentre as células-tronco, as mesenquimais são de grande interesse pela facilidade de obtenção e por poderem ser utilizadas em transplantes autógenos, sendo a medula óssea a maior fonte para sua obtenção (Kotobuki *et al.*, 2004). Pesquisas têm apontado inúmeras possibilidades

para a reparação tecidual e melhoria nos resultados dos processos regenerativos quando células derivadas da medula óssea são utilizadas (Kotobuki *et al.*, 2004; Suter *et al.*, 2004).

No entanto, a medula óssea é formada por uma população celular heterogênea, sendo limitado o número de células-tronco mesenquimais - com capacidade de se diferenciar em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular (Minguell *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2009) - na cavidade medular óssea. Desta forma, a medula óssea é composta por células indiferenciadas hematopoiéticas, as quais repõem as células sanguíneas que vão sendo eliminadas; células maduras do sangue; fragmentos de estroma e gordura; além de possuir células-tronco mesenquimais. A presença de células mesenquimais indiferenciadas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Friedenstein *et al.* (1966), os quais encontraram em cultura de células da medula óssea uma população celular com capacidade de aderência ao plástico, com morfologia semelhante a fibroblastos, as quais isoladas e posteriormente expandidas podiam ser conduzidas à diferenciação em múltiplas linhagens fenotípicas, incluindo células formadoras de tecido ósseo (Owen & Friedenstein, 1998; Pittenger *et al.*, 1999). Embora as células mesenquimais da medula óssea constituam uma pequena parcela de toda população celular deste tecido, correspondendo a cerca de 0,001 a 0,01 de todas as células nucleares (Pittenger *et al.*, 1999), a proliferação e expansão das mesmas, sob condições adequadas, são facilmente obtidas *in vitro* (Kraus & Kirker-Head, 2006).

2.4 - Engenharia tecidual baseada no transplante de células derivadas da medula óssea

Diversos estudos em animais têm demonstrado a habilidade das células derivadas da medula óssea na formação ectópica de osso (Chen *et al.*, 2002, 2003, 2004; Abukawa *et al.*, 2003, 2004; Yamada *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2008), na regeneração de defeitos ósseos alveolares (De Volk *et al.*, 2003; Abukawa *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005; Marei *et al.*, 2005) e de ossos longos (Srouji & Livne, 2005) e no ganho ósseo associado à elevação do seio maxilar (Ohya *et al.*, 2005).

Frente às evidências que mostraram que células provenientes da medula óssea podem ser direcionadas à linhagem osteoblástica, promovendo formação de osso em diferentes situações, pode-se sugerir que o uso de tais células poderia interferir positivamente na regeneração do tecido ósseo associada à implantodontia. Embora não haja na literatura estudos avaliando, de maneira

controlada, o papel da engenharia tecidual baseada no transplante de CMs na regeneração óssea ao redor de implantes dentais, algumas investigações neste contexto têm sido relatadas (Yamada *et al.*, 2004, 2008; Ueda *et al.*, 2005; Pieri *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

Yamada *et al.* (2004) investigaram em cães o reparo ósseo ao redor de implantes inseridos em regiões com osso regenerado. Para tanto, um mês após as exodontias, foram criados defeitos alveolares na mandíbula dos cães, os quais receberam diferentes tratamentos regenerativos, de acordo com os grupos: plasma rico em plaquetas (PRP) associado à presença de CMs autógenas, osso particulado da crista ilíaca associado às CMs autógenas, PRP isoladamente ou grupo controle (sem tratamento). Dois meses depois, os defeitos ósseos tratados receberam implantes dentais e, após dois meses do procedimento, avaliações histológicas do reparo ósseo ao redor dos implantes foram realizadas. Os autores concluíram que a associação de PRP e CMs promoveu resultados favoráveis, apresentando contato osso-implante e densidade óssea comparável àquela obtida no grupo que combinou o uso de enxerto da crista ilíaca com CMs.

Ueda *et al.* (2005) avaliaram clinicamente, por meio de relatos de casos, o uso combinado de células autógenas derivadas da medula óssea com PRP em carreadores de β -tricálcio fosfato, para aumento ósseo associado ao levantamento de seio maxilar e colocação simultânea de implantes dentais. De acordo com os resultados, foi demonstrado ganho de tecido ósseo pós-operatório significativo após a utilização desta abordagem terapêutica. Similarmente, Yamada *et al.* (2008), em um estudo clínico de relato de casos acompanhados entre 2 a 6 anos, relataram que a combinação de células autógenas da medula óssea com PRP aplicada em conjunto com enxertos ósseos no levantamento de seio maxilar promoveu aumento significativo da altura óssea, apresentando resultados estáveis, mesmo após o carregamento protético. Outro estudo, realizado em animais, investigou o reparo peri-implantar após o uso de células provenientes da medula óssea em associação com o PRP no levantamento de seio maxilar, relatando o potencial desta estratégia regenerativa no aumento da formação óssea e da osseointegração dos implantes dentais (Pieri *et al.*, 2008).

Kim *et al.* (2009) avaliaram em cães o potencial de duas fontes de células mesenquimais autógenas - medula óssea e ligamento periodontal - na regeneração óssea de defeitos retangulares criados cirurgicamente ao redor de implantes dentais. Deste modo, três meses

após a realização das exodontias, os defeitos criados envolvendo os implantes dentais foram tratados com um dos tipos de células inseridas no carreador ou receberam apenas o carreador sem a presença de nenhum tipo celular (controle). Uma barreira de colágeno foi, em seguida, posicionada sobre todos os implantes, envolvendo os defeitos ósseos. Após o período de reparo, os resultados histomorfométricos demonstraram que os defeitos peri-implantares tratados com terapia celular apresentaram melhores resultados em termos de regeneração de novo osso que o grupo controle e que as células derivadas da medula óssea foram mais promissoras que as células do ligamento periodontal para a neoformação óssea na área do defeito. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à porcentagem de contato osso-implante.

3 - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar histometricamente o reparo ósseo em defeitos de deiscência ao redor de implantes tratados com a utilização de células autógenas derivadas da medula óssea, isoladamente ou em associação à técnica de regeneração óssea guiada.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram selecionados para este estudo oito cães machos da raça beagle com aproximadamente dois anos de idade, pesando em média 20 kg, em bom estado de saúde geral e dentição completa. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, sob as mesmas condições ambientais, em baias individuais, sendo alimentados com ração para animais e água “*ad libitum*”.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Unicamp (CEMIB) (Protocolo nº 1088-1) (Anexo 1).

4.2 - Isolamento e cultura das células derivadas da medula óssea

A medula óssea foi obtida a partir da crista ilíaca de cada um dos oito cães envolvidos no estudo, mediante punção aspirativa (10mL) por meio de agulha Illinois descartável, em seringas descartáveis de 20mL contendo heparina (100U/mL de medula óssea) (Kadiyala *et al.*,1997) (Figuras 1a e 1b).

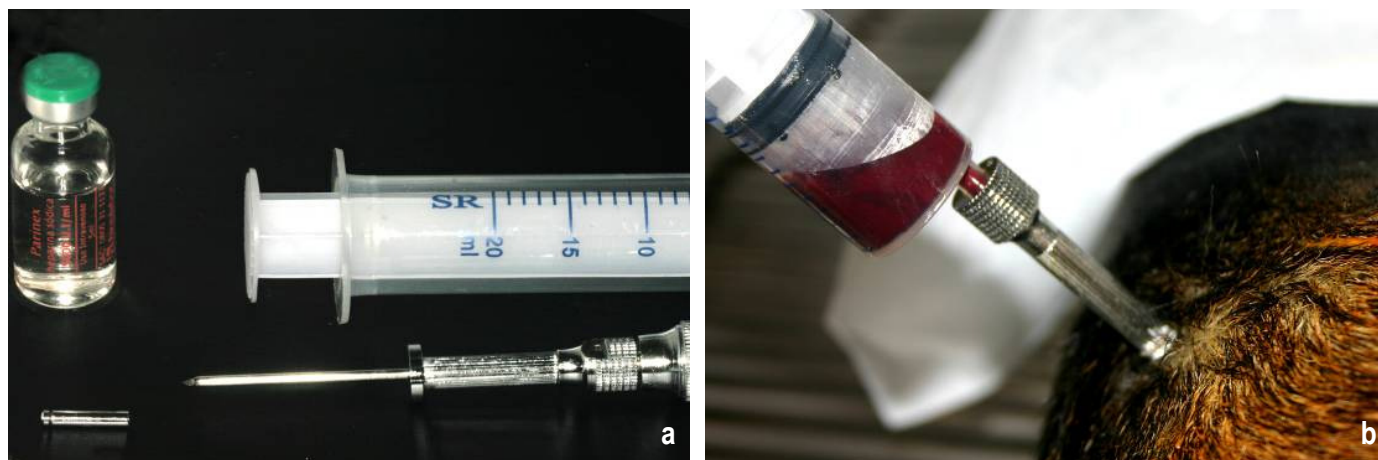


Figura 1. Agulha Illinois, seringa e heparina utilizados para a obtenção da medula óssea (a). Punção aspirativa para coleta da medula óssea da crista ilíaca (b).

O isolamento e cultura das células da medula óssea foram realizados de acordo com Kern *et al.* (2006), por meio da separação de células mononucleares por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque. Deste modo, 10mL de cada amostra de medula óssea foram diluídos em volume igual de tampão fosfato salino (PBS) (Gibco/Invitrogen Corporation, EUA). Em seguida, foi adicionada a solução de gradiente Ficoll-Paque (13mL) (Amersham Bioscience, Suécia) no fundo do tubo, e a separação das células sanguíneas ocorreu após a centrifugação em 700g por 30 minutos, à 20°C (Figura 2a). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células mononucleares localizadas na interface foram coletadas cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur, transferidas para outro tubo e lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS), sendo que em cada lavagem essas células foram centrifugadas em 700g por 10 minutos à temperatura ambiente (Figura 2b). Então, as células mononucleares foram resuspendidas em um pequeno volume de PBS para contagem em hemocitômetro. Em seguida, essas células foram semeadas em garrafas para cultura de 25cm² a uma concentração de 10⁶ células/mL e incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ em meio de cultura padrão composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com baixa concentração de glicose (Gibco Brl, EUA) suplementado com 10% de FBS (Gibco Brl, EUA), 100µg/mL de estreptomicina, 100U/mL de penicilina e 2mM de L-glutamine (Gibco Brl, EUA). Após 7 dias, o meio de cultura foi trocado pela primeira vez e, em seguida, o meio foi trocado a cada 4 dias até as células aderidas ao substrato plástico alcançarem confluência. Em confluência, as células aderidas foram tripsinizadas com a solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM (Gibco Brl, EUA), resuspendidas em 5mL de meio de cultura padrão, e centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e as células resuspendidas em 3 a 5mL de DMSO – meio de congelamento (Gibco Brl, EUA) e definidas como passagem 1. Cada 0,5mL desta suspensão celular foi transferido para um vial e congelado em nitrogênio líquido para a execução das fases subsequentes do experimento.

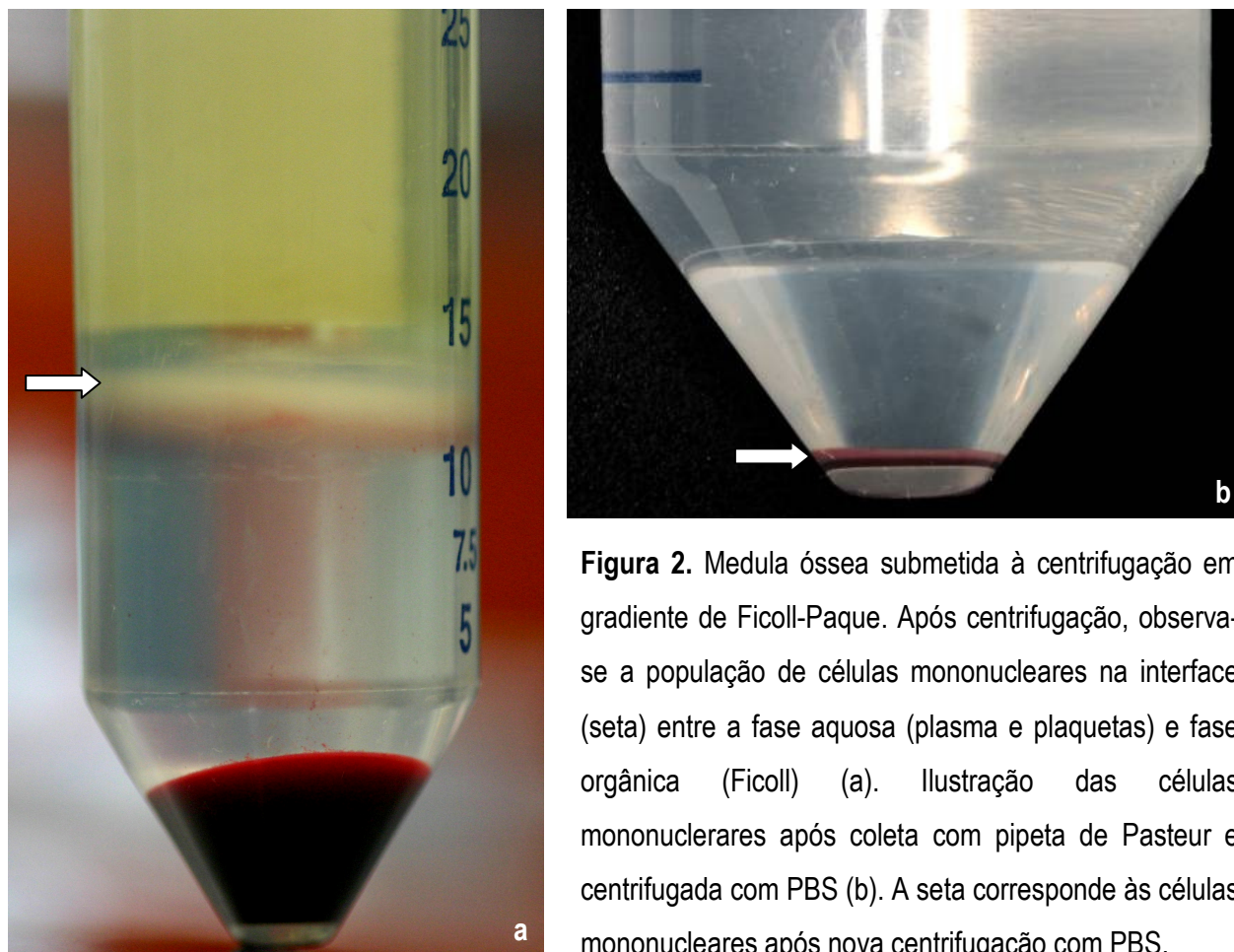


Figura 2. Medula óssea submetida à centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque. Após centrifugação, observa-se a população de células mononucleares na interface (seta) entre a fase aquosa (plasma e plaquetas) e fase orgânica (Ficoll) (a). Ilustração das células mononucleares após coleta com pipeta de Pasteur e centrifugada com PBS (b). A seta corresponde às células mononucleares após nova centrifugação com PBS.

4.3 - Caracterização fenotípica

Células derivadas da medula óssea foram submetidas a condições osteogênicas a fim de determinar o seu potencial em promover a formação de nódulos minerais *in vitro* e expressarem marcadores ósseos.

Para tanto, após a cultura primária das células da medula óssea atingir confluência, uma parte destas células foi congelada, conforme descrito no item 4.2, e a outra foi semeada em pratos de 100 X 20mm na passagem 1, e cultivadas em meio de cultura padrão, em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂. Após estas células alcançarem confluência, o meio de cultura foi aspirado, as células foram tripisnizadas com solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM (Gibco/Invitrogen Corporation, EUA) e resuspensas em meio de cultura padrão. Em seguida, essas células foram semeadas a uma densidade de 3×10^3 células/cm² em placas para cultivo celular de 24 poços para a

avaliação da formação de nódulos minerais e em pratos de 60X15mm para o ensaio de expressão gênica, e mantidas em meio de cultura padrão. Após 24 horas, iniciou-se a indução osteogênica, utilizando-se o meio de diferenciação osteogênico composto por DMEM, FBS 10%, 50µg/mL de ácido ascórbico, 10mM de β-glicerolfosfato e 10⁻⁵ M de dexametasona.

4.3.1 - Ensaio de mineralização

Após o período de 14 dias de indução para diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio Von Kossa (Bertram *et al.*, 2005), com o objetivo de se determinar a formação de nódulos minerais. Para isso, o meio de cultura foi removido, cada orifício foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1mL por poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram re-hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, 5 minutos cada), e lavadas em água destilada duas vezes. Depois, foram lavadas em uma solução de AgNO₃ 5% e incubadas a 37°C no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse. O último passo foi a desidratação das células em concentrações crescentes de etanol (50% até 100%, 2 minutos cada). Finalmente, o etanol foi removido e os poços secos ao ar livre. Um grupo controle foi mantido em meio de cultura padrão (DMEM, 10% FBS, penicilina/estreptomicina), sendo este trocado a cada três dias durante o mesmo período do grupo teste (meio de diferenciação osteogênica).

4.3.2 - Análise da expressão gênica

4.3.2.1 - Extração do RNA total

Após as células da medula óssea terem sido cultivadas por 3 dias em condições osteogênicas (Castano-Izquierdo *et al.*, 2007), o RNA total das populações celulares foi extraído utilizando o método do fenol/clorofórmio, a fim de avaliar a expressão dos genes para fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e colágeno tipo I (COL I). Para tanto, o meio de cultura celular foi aspirado e as células foram lavadas com 1mL de PBS, e depois foi adicionado 1mL de Trizol® Reagent (Gibco Brl, EUA). Após a homogeneização utilizando um “cell scraper” (BD Falcon, México), as células foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados

200µl de clorofórmio (Merck, Alemanha), seguido por incubação por 10 minutos e centrifugação a 11500rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa contendo o RNA total foi coletada, transferida para outro tubo e incubada com 500µl de isopropanol (Merck, Alemanha) por 10 minutos para precipitação do RNA. Após centrifugação a 11500rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de RNA total adquirido foi lavado com 500µl de etanol 75% gelado (Merck, Alemanha) e centrifugado a 11500rpm a 4°C por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para secagem. Em seguida, o material foi ressuspensionado em água tratada com DEPC e os tubos contendo as amostras foram armazenados a -70°C.

Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, 1µg de RNA de cada amostra foi separado em um gel de agarose a 1,2%, por meio de eletroforese a 70V constante, por 40 minutos, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado por meio do programa Image Máster VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença e integridade das bandas do RNA ribossômico, 28S e 18S.

4.3.2.2 - Síntese de DNA complementar (cDNA) e RT-PCR

As amostras de RNA total extraídas, com comprovada qualidade, foram tratadas com DNase (Turbo DNA-free®, Ambion, EUA) para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante, seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA total de cada amostra, utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RTPCR (Invitrogen, EUA), por meio do “primer” oligo (dT), seguindo as instruções do fabricante.

Os “primers” para Glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase - Gapdh (gene de referência) (forward primer: 5'- CCAGAACATCATCCCTGCT-3', reverse primer: 5'- ACTACCTTCTTGATGTCGTCATATT-3'), ALP (forward primer: 5'- GGGCAACTCTATCTTTGGTCTG-3', reverse primer: 5'- CTGGTAGTTGTTGTGAGCG-3'), BSP (forward primer: 5'- GGTACATAGGTCTAGCTGCAATC -3', reverse primer: 5'- TGGTGCTGTTTATACCTTGCC-3') e COL I (forward primer: 5'- GTGTCCGTGGTCTGACT -3', reverse primer: 5'- TCACCTTTAGCACCAGGTTG -3') foram desenhados com o auxílio de um software LightCycler® Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnosis GmbH, Alemanha), e as reações para cada “primer”

foram otimizadas anteriormente ao início das reações de PCR propriamente ditas. Reações de amplificação foram realizadas para por um ciclo de pré-incubação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 segundos; anelamento a 55°C e extensão a 72°C por, respectivamente, 5segundos/7segundos (Gapdh), 3segundos/6segundos (ALP), 5segundos/7segundos (BSP), 2segundos/8segundos (Col I). A expressão de Gapdh foi utilizada para controle interno da integridade de RNA e da eficiência do processo de transcrição. Os produtos de amplificação das amostras foram visualizados em gel de agarose 2.0% corado com brometo de etídio e fotografados sob luz UV.

4.4 - Análise em microscopia eletrônica de varredura

Com o intuito de avaliar a presença, morfologia e adesão de células da medula óssea inseridas no carreador, uma avaliação utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada. Deste modo, CMs foram semeadas no carreador (Esponja de Colágeno - BD 3D Collagen Composite, EUA) na densidade de 2×10^7 células/carreador e cultivadas em meio padrão durante 24 horas. Posteriormente, o meio foi removido por aspiração, as esponjas lavadas com 2mL de PBS e então fixadas com solução de Karnovsky, durante 24 horas. As amostras foram desidratadas por série crescente de acetona (Qeel, São Paulo, SP, Brasil) (50%, 75%, 85%, 90%, 95% e 100%), e ao final desidratadas ao ponto crítico (Denton Vacuum DCP-1 – Critical Point), seguido de metalização em ouro (Denton Vacuum Desk II) e análise em MEV. Uma esponja sem células, contendo apenas meio padrão, foi utilizada como controle. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura com aumento variando entre 150 e 3500 vezes. A análise das imagens foi descritiva.

4.5 - Procedimentos cirúrgicos

4.5.1 - Exodontias

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os cães foram sedados com cloridrato de dihidrotiazina, aplicado por via intramuscular (Rompun® - Bayer do Brasil S.A., Brasil) na dose de 0,1mL/kg. A anestesia geral foi induzida pela administração intravenosa de tiopental sódico (Tiopental® - Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Brasil) na dose de 25mg/kg, seguida por anestesia local (Xilocaína 2% Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Brasil.).

Posteriormente, foram realizadas as exodontias dos primeiros molares e terceiro e quarto pré-molares inferiores, dos dois lados da mandíbula. Incisões intra-sulculares foram realizadas nas faces vestibular e lingual, retalhos de espessura total foram elevados e os dentes foram seccionados ao nível da bifurcação de suas raízes com auxílio de brocas (Carbide FG nº 701 - SS White Artigos Dentários Ltda, Brasil) em alta rotação e irrigação contínua com soro fisiológico estéril 0,9%. As raízes mesiais e distais foram removidas separadamente, os alvéolos curetados e os tecidos posicionados e suturados (Figuras 3a – 3d).

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e após quatro dias das exodontias, foi administrado antibiótico, uma associação de penicilina e estreptomicina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório Wyeth – White Hall Ltda, Brasil), de forma subcutânea, com o objetivo de minimizar qualquer risco de infecção da área cirúrgica. Um antiinflamatório não-esteroidal (Flunixin Meglumine - Banamine® Ind. Quim. e Farm Schering - Plough S/A Veterinária, Brasil), na dosagem de 0,1mL/10kg, foi administrado por 5 dias consecutivos, uma vez ao dia, de forma subcutânea, com o objetivo de controlar a dor e o edema pós-operatório.

Durante um período de 15 dias pós-operatórios, os animais receberam alimentação pastosa (BomGuy, Dumilho SA, Indústria e Comércio, Brasil) com o objetivo de evitar traumatismos sobre a região operada.

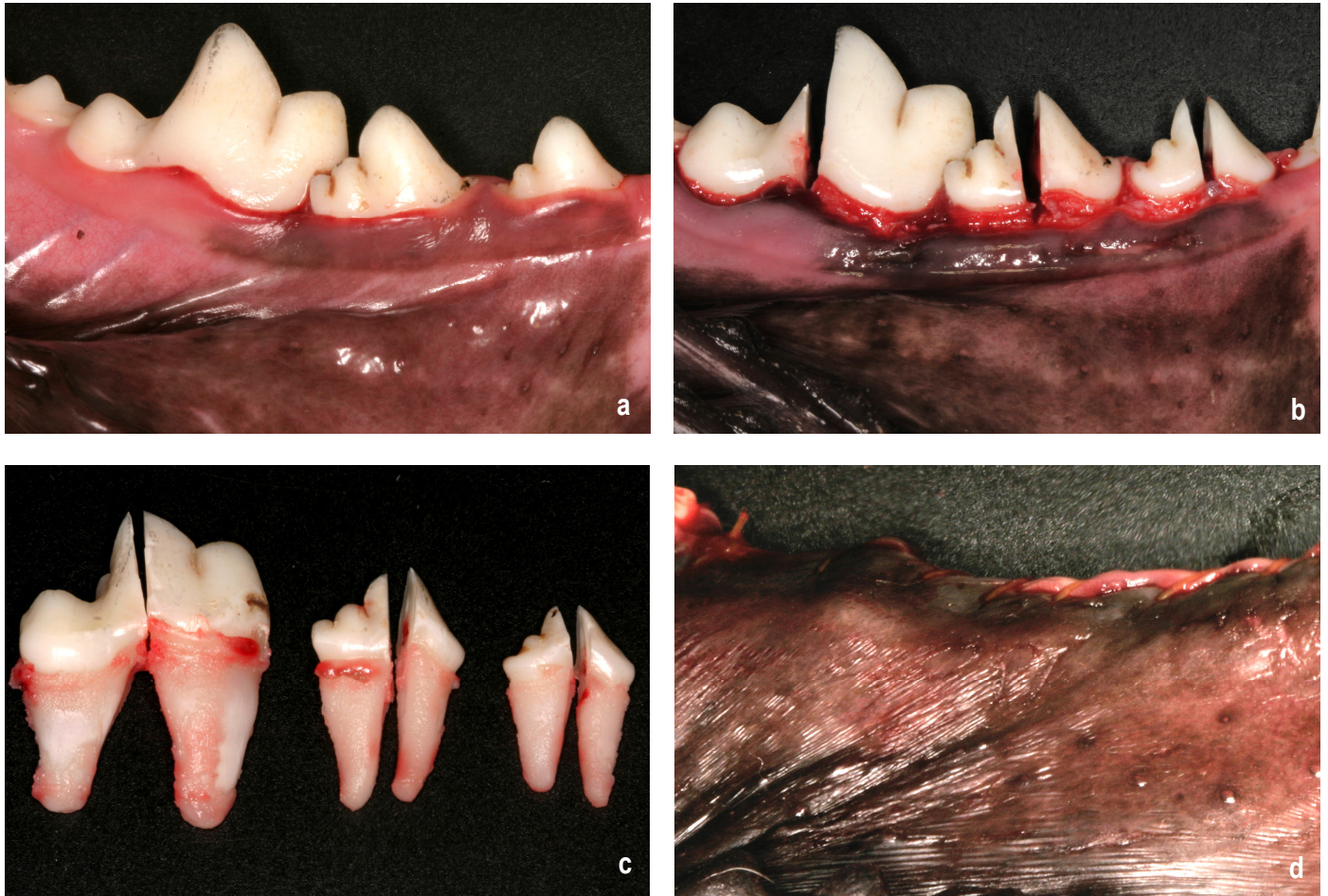


Figura 3. Ilustração clínica inicial, anteriormente ao procedimento cirúrgico (a). Retalho rebatido e seccionamento do primeiro molar e terceiro e quarto pré-molares inferiores antes (b) e após as exodontias (c). Sutura dos retalhos (d).

4.5.2 - Criação dos defeitos ósseos de deiscência e colocação dos implantes

Quinze dias antes dos procedimentos de colocação dos implantes, criação e tratamento dos defeitos ósseos, as mandíbulas dos animais foram radiografadas, e o cálculo e biofilme dental supragengival foram removidos por meio de pontas ultra-sônicas e profilaxia dental.

Três meses após as exodontias, foi realizada uma incisão sobre o rebordo ósseo e um retalho de espessura total foi elevado com a finalidade de expor o tecido ósseo subjacente. Após regularização do rebordo, foram preparados seis leitos ósseos, três em cada hemi-mandíbula, para colocação dos implantes. Posteriormente ao preparo dos leitos, foram criados seis defeitos ósseos, tipo deiscência, na vestibular dos leitos dos implantes, com dimensões de 4,0mm de largura por 5,0mm de altura (Casati *et al.*, 2007). As deiscências foram confeccionadas com o auxílio de brocas carbide 703 e cinzéis de Oschinbein (Neumar Instrumentos Odontológicos LTDA, Brasil) (Figuras 4a - 4c).

Uma vez criadas as deiscências ósseas vestibulares, seis implantes de titânio (4 X 8,5 mm) de superfície usinada (Biomet - 3i™ do Brasil LTDA, Brasil) foram colocados (Figura 4d).

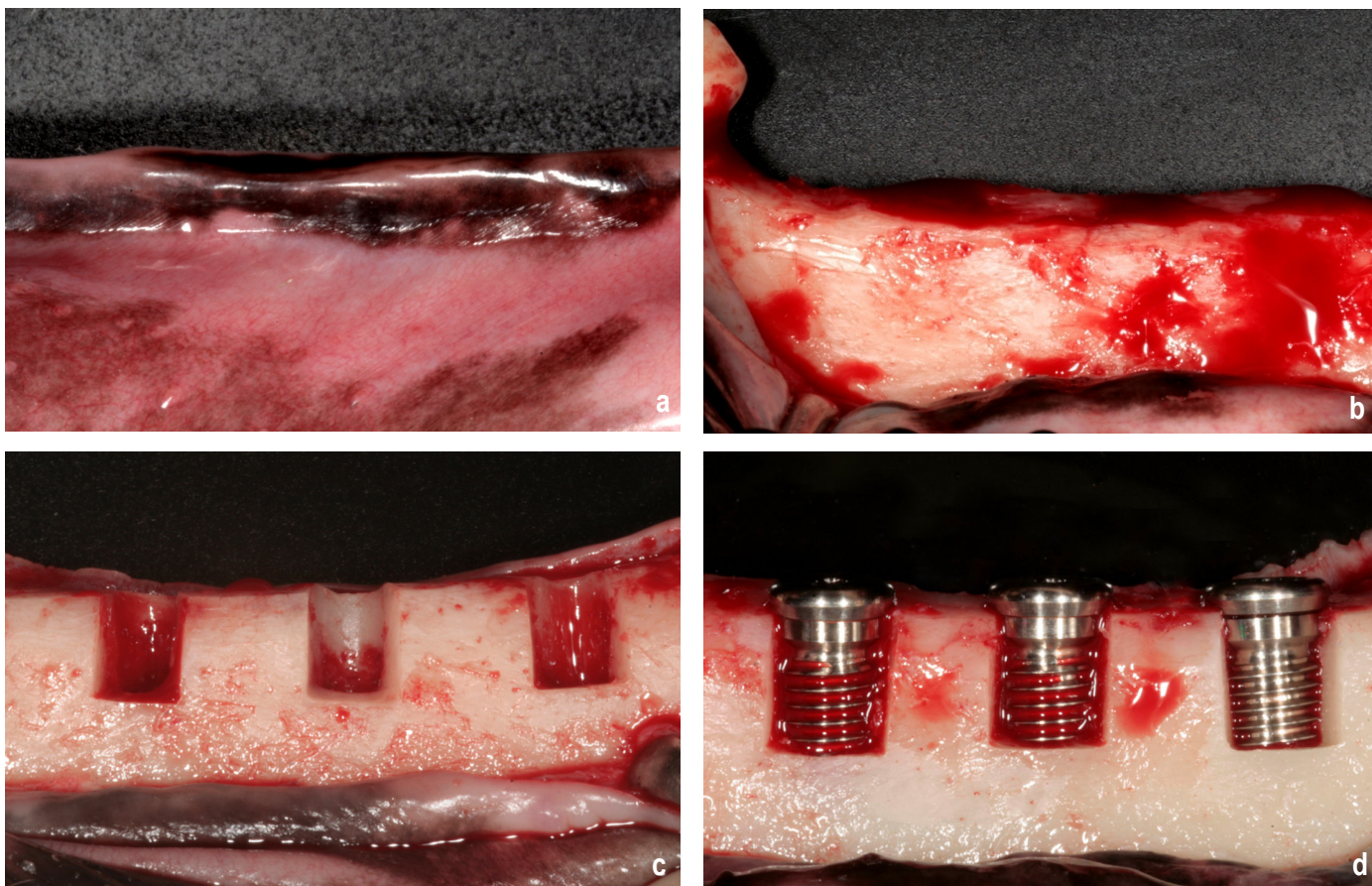


Figura 4. Ilustração clínica do rebordo, três meses após as exodontias (a). Acesso ao tecido ósseo por meio de retalhos mucoperiosteais e regularização do rebordo (b). Confecção dos leitos cirúrgicos para colocação dos implantes dentais e criação dos defeitos ósseos de deiscência na face vestibular (c). Colocação dos implantes (d).

4.5.3 - Tratamento dos defeitos ósseos

Após a colocação dos implantes, os defeitos peri-implantares foram aleatoriamente designados a serem tratados por um dos seguintes grupos (Figuras 5a e 5b):

- 1) ROG+CMs+C: membrana de PTFE-e com reforço de titânio combinada à utilização de células derivadas da medula óssea semeadas no carreador
- 2) ROG+C: membrana de PTFE-e com reforço de titânio combinada à utilização do carreador sem células
- 3) ROG: membrana PTFE-e com reforço de titânio

4) CMS+C: células derivadas da medula óssea semeadas no carreador

5) C: carreador sem células

6) Controle: nenhum tratamento

Nos implantes selecionados para o tratamento com ROG, a membrana de PTFE-e com reforço de titânio (Gore-Tex® TR4Y, Flagstaff, EUA) foi recortada e ajustada sobre o local do defeito ósseo, ultrapassando dois a três milímetros das margens do defeito, e foram fixadas com parafusos metálicos estéreis auto-rosqueáveis.

Para os grupos designados ao tratamento envolvendo a utilização das CMs, os seguintes procedimentos foram realizados previamente à utilização das células nos defeitos: 2×10^7 células/carreador (Esponja de Colágeno - BD 3D Collagen Composite, EUA) foram semeadas na esponja de colágeno e cultivadas em meio de cultura padrão por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico (DMEM, 10% FBS, 50µg/mL de ácido ascórbico, 10mM de β-glicerolfosfato, 10^{-5} M de dexametasona) e as células inseridas no carreador foram cultivadas por três dias. Com o intuito de evitar reações imunológicas decorrentes do uso do soro fetal bovino, as células carreadas na esponja de colágeno foram mantidas em DMEM na ausência de FBS por um período de 12 horas (*serum starvation*) previamente ao transplante nos defeitos, o qual foi realizado imediatamente antes da colocação das membranas, nos defeitos alocados para esta associação de tratamento. Nos grupos que receberam os carreadores sem as células, as esponjas de colágeno foram submetidas aos mesmos procedimentos, na ausência de células.

Seguindo os tratamentos, os retalhos foram posicionados e suturados com suturas interrompidas e contínuas não reabsorvíveis de PTFE (Gore-Tex®, Flagstaff, EUA) de maneira a recobrir totalmente os implantes e os materiais utilizados (Figura 6).

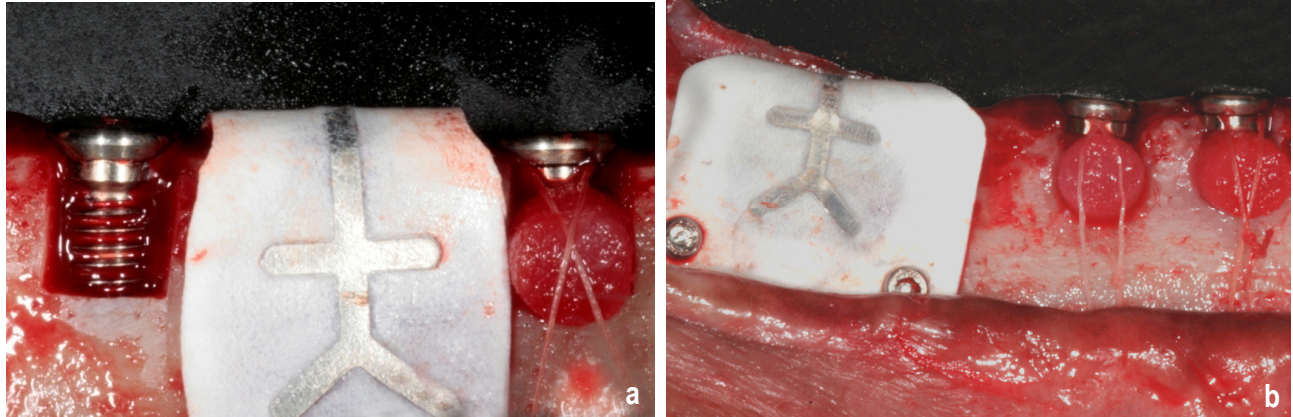


Figura 5. Ilustração clínica de hemi-mandíbulas apresentando três defeitos de deiscência cada uma, os quais foram tratados de acordo com os grupos experimentais escolhidos aleatoriamente em cada animal.



Figura 6. Retalhos suturados recobrindo totalmente os implantes e os materiais utilizados.

A fim de minimizar riscos de infecção e para controle da dor e do edema pós-operatório, os animais receberam as mesmas medicações administradas após os procedimentos de exodontias. Durante todo período pós-operatório até o momento do sacrifício, os animais receberam alimentação pastosa (BomGuy, Dumilho SA, Indústria e Comércio, Brasil) e, para controle químico do biofilme dental, foi realizada aplicação tópica de Digluconato de Clorexidina 0,2% durante os três meses de reparo.

4.6 - Sacrifício dos animais

Após três meses do tratamento dos defeitos ósseos, os animais foram sacrificados por meio de perfusão cardíaca. As mandíbulas foram removidas e colocadas em formol 4% tamponado, pH neutro por 48 horas. Nas primeiras 24 horas, os tecidos duros adjacentes foram seccionados em blocos contendo apenas um implante em cada espécime, os quais foram codificados para que o examinador não soubesse a que grupo pertencia cada implante.

4.7 - Processamento Histológico

Após o processo de fixação e posterior lavagem com água destilada, os espécimes foram desidratados em uma série de solução de álcool etílico (60-100%) sob constante agitação. A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC – Kulzer, Alemanha) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos e polimerizados por 10 horas. Os blocos de resina foram removidos do molde e montados em lâmina acrílica com o auxílio de resina (Technovit 4000, Kulzer, Alemanha).

Por meio da utilização de um sistema de corte (Exakt – Cutting. System, Apparatebau Gmbh, Alemanha), foi realizado um corte longitudinal preliminar e obtida uma secção de 300-500µm de espessura. Esta secção foi submetida a um sistema de microdesgaste (Exakt – Micro Grinding System®, Apparatebau Gmbh, Alemanha), resultando em uma secção de aproximadamente 50µm de espessura, representando uma lâmina da porção mais central do defeito por implante dental (Donath & Breuner, 1982). As secções obtidas foram então coradas com coloração de Azul de Toluidina a 1%. Posteriormente, as imagens da região central do defeito ósseo foram capturadas por

uma câmera acoplada em um microscópio óptico e armazenadas no computador para que fossem realizadas as análises.

4.8 - Avaliação Histométrica

Com o auxílio de um programa para análise de imagens (Image Pro, Media Cybernetics, EUA) os seguintes parâmetros foram avaliados (Figura 7):

- *Contato direto osso-implante (CO)*: porcentagem de contato direto osso-implante em toda extensão da superfície do implante correspondente à região do defeito ósseo.
- *Preenchimento ósseo dentro das roscas (PR)*: porcentagem de preenchimento por tecido ósseo neoformado dentro das roscas do implante na região do defeito.
- *Área de tecido ósseo fora das roscas (AF)*: área total de novo osso formado na região fora das roscas do implante, medida em mm².

Todas as medidas foram realizadas por um único examinador, calibrado para a realização das mensurações. A calibração intra-examinador foi realizada por meio da avaliação de sete fotomicrografias não associadas ao estudo, as quais apresentavam defeitos peri-implantares de deiscência similares aos do presente estudo. As mensurações de todos os parâmetros foram realizadas duas vezes, dentro de 24 horas. O teste de correlação intra-classe mostrou 97% de reprodutibilidade para PR, 92% para AF e 95% para CO.

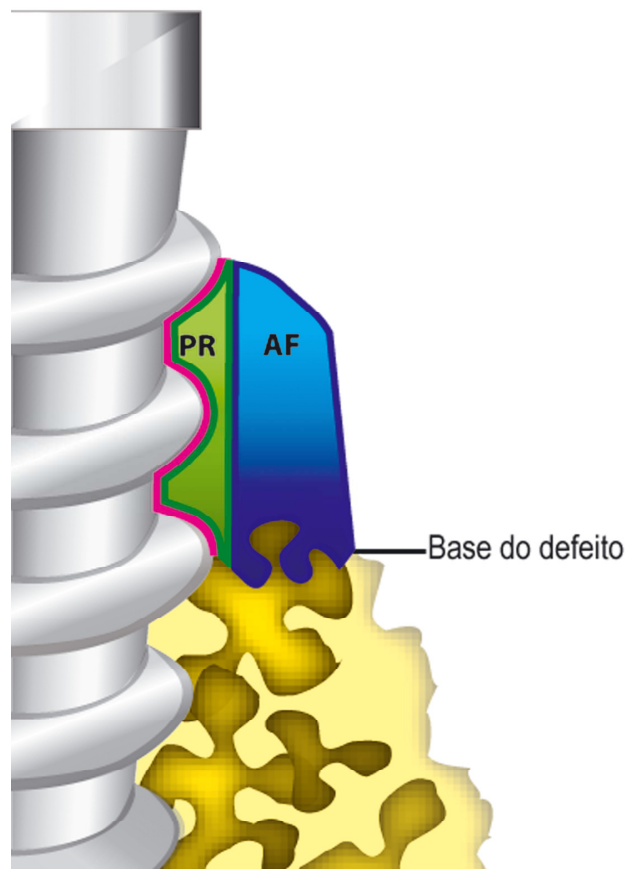


Figura 7: Esquema ilustrando parâmetros histológicos avaliados: A linha rosa corresponde ao parâmetro contato osso-implante. PR: representa o preenchimento ósseo dentro das rosca do implante (região verde). AF: representa a área de novo osso formado fora das rosca do implante (região azul).

4.9 - Análise Estatística

O presente estudo foi baseado em um delineamento experimental em bloco ao acaso. Os dados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA two-way) ($\alpha = 5\%$) para testar a hipótese da ausência de diferenças entre os tratamentos para os parâmetros avaliados.

5 - RESULTADOS

5.1 - Caracterização *in vitro* das células derivadas da medula óssea

No presente estudo, para demonstrar a habilidade das CMs em se diferenciarem em células formadoras de nódulos minerais, a diferenciação osteogênica foi induzida pela adição de meio de cultura contendo ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerolfosfato. Após 14 dias, as CMs de todos os animais foram capazes de produzir deposição de nódulos minerais em níveis variados, visualizados pelo método de Von kossa (Figuras 9a - 9c).

Adicionalmente, genes conhecidos por serem marcadores de células osteogênicas, incluindo fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I, foram avaliados. Análises de RT-PCR demonstraram que os marcadores ósseos (ALP, BSP e COL I) foram expressos nas CMs de todos os animais, após três dias sob condições osteogênicas (Figura 9d).

Com o objetivo de examinar a morfologia, inserção e adesão das CMs carregadas nas esponjas de colágeno, análises em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas. Foi observado que, após três dias em meio de cultura, as células apresentavam-se inseridas e homogeneamente dispersas na estrutura do carreador, apresentando morfologia de células fibroblásticas e confirmando a disponibilidade das células no carreador para utilização subsequente nos tratamentos dos defeitos ósseos (Figuras 9e - 9g).

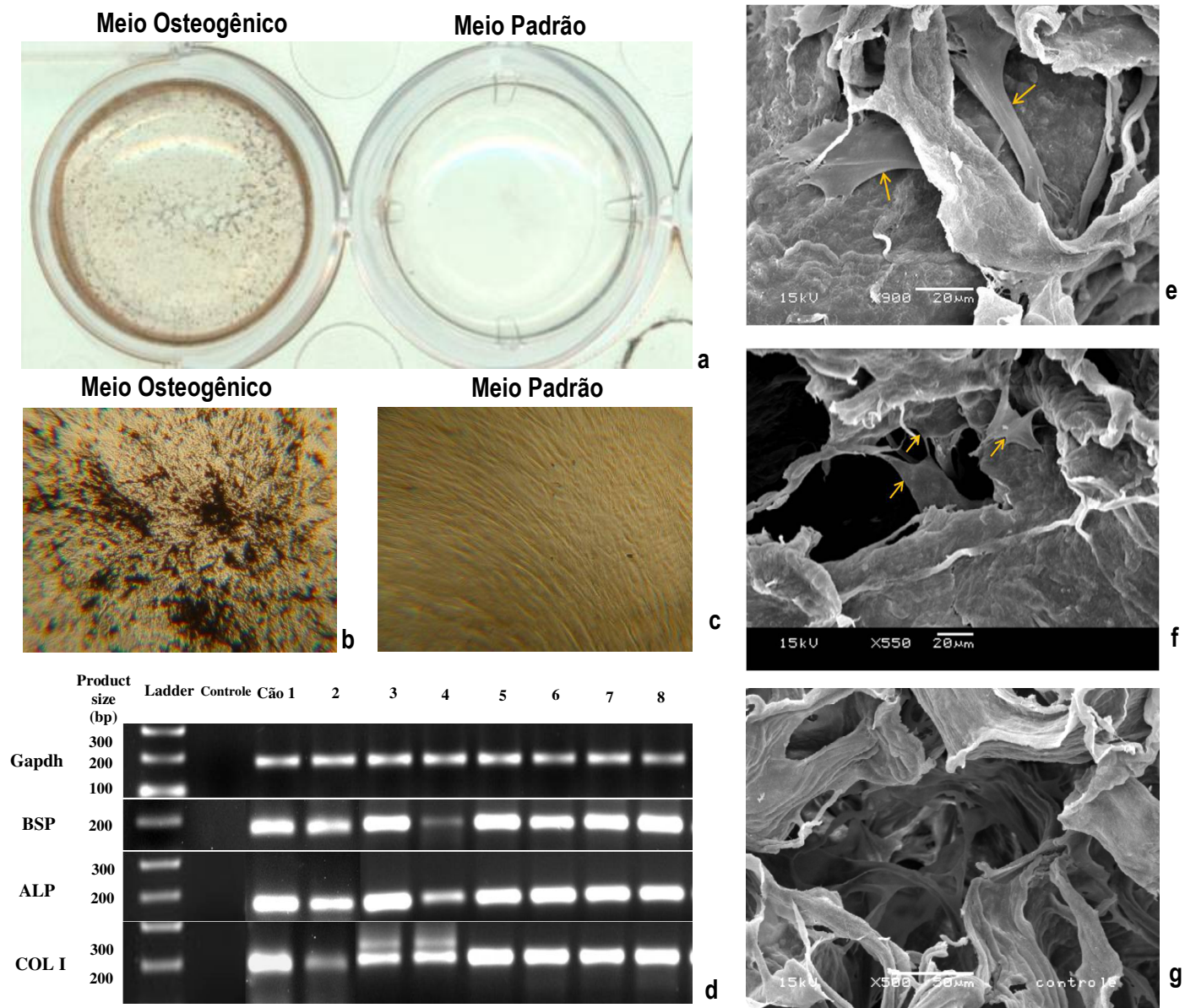


Figura 9. Painel ilustrando os resultados das avaliações *in vitro*: **a-c) Ensaio de mineralização:** Células derivadas da medula óssea, cultivadas durante duas semanas sob condições osteogênicas, foram capazes de produzir nódulos minerais, como visualizado pelo ensaio de Von kossa (coloração escura é indicativa de culturas positivas para a análise de Von kossa, correspondendo à presença de nódulos minerais). **d) Análise da expressão gênica:** Expressão de mRNA de COL I, BSP e ALP nas células derivadas da medula óssea submetidas à diferenciação osteogênica. Análises de RT-PCR demonstraram que todos os marcadores ósseos foram expressos sob condições osteogênicas. **e-g) Microscopia eletrônica de varredura:** Após serem cultivadas no carreador, CMs foram observadas inseridas homogeneamente na estrutura da esponja. Células da medula óssea presentes dentro do carreador estão destacadas pelas setas (550-900X) (e,f). Carreador utilizado como controle, sem a presença de CMs (500X) (g). CMs: células derivadas da medula óssea, ALP: fosfatase alcalina, BSP: sialoproteína óssea, COL I: colágeno tipo I.

5.2 - Observações clínicas

Durante os três meses de pós-operatório, os cães permaneceram em boa saúde, sem nenhuma complicação de ordem geral. No pós-operatório inicial, nenhum sinal clínico de inflamação ou reação adversa dos tecidos (deiscência ou formação de abscessos ou supuração) foi observado. No entanto, durante o período de reparo do estudo, três defeitos peri-implantares (dois do grupo ROG+CMs+C e um do grupo ROG) apresentaram exposição da barreira. Nestes casos, as membranas expostas foram removidas e os três implantes relacionados à exposição não foram incluídos na análise estatística.

5.3 - Análise Histométrica

Análises histométricas inter-grupo revelaram que todos os defeitos tratados com barreira demonstraram resultados estatisticamente similares entre si com relação à área de osso neoformado fora dos limites das roscas (**ROG+CMs+C**: $3,17 \pm 0,59\text{mm}^2$; **ROG+C**: $3,00 \pm 1,13\text{mm}^2$; **ROG**: $3,46 \pm 0,87\text{mm}^2$) ($p>0,05$), sendo estes valores estatisticamente superiores aqueles obtidos pelos demais grupos (**CMs+C**: $1,02 \pm 0,44\text{mm}^2$; **C**: $0,81 \pm 0,67\text{mm}^2$; **Controle**: $0,54 \pm 0,89\text{mm}^2$) ($p<0,05$) (Tabela 1).

Com relação à porcentagem de preenchimento ósseo dentro das roscas do implante, os grupos que receberam membrana - **ROG+CMs+C** ($38,66 \pm 12,08\%$), **ROG+C** ($34,41 \pm 18,02\%$), **ROG** ($39,43 \pm 14,20\%$) - apresentaram preenchimento ósseo estatisticamente similar entre si e semelhante ao grupo tratado com células sem barreira - **CMs+C** ($35,47 \pm 20,75\%$) ($p>0,05$), enquanto todos estes grupos mostraram preenchimento ósseo significativamente superior quando comparados ao grupo **Controle** ($9,96 \pm 13,38\%$) ($p<0,05$) (Tabela 1).

Adicionalmente, embora a porcentagem de contato osso-implante tenha sido superior nos defeitos tratados com membrana ($32,94 \pm 9,48\%$; $29,90 \pm 6,49\%$ e $34,83 \pm 9,46\%$ para os grupos **ROG+CMs+C**, **ROG+C** e **ROG**, respectivamente), quando comparada à porcentagem de contato obtida nos grupos **C** e **Controle** ($12,88 \pm 10,06\%$ e $11,04 \pm 13,93\%$, respectivamente) ($p<0,05$), pôde ser observada uma tendência para aumento da extensão de contato osso-implante no grupo **CMs+C**, que utilizou as células sem a associação da ROG ($25,39 \pm 15,40\%$) (Tabela 1).

As Figuras 10a -10d ilustram os achados histométricos obtidos.

Tabela 1. Média e desvio padrão de PR, CO e AF nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	PR (%)	CO (%)	AF (mm²)
ROG+CMs+C	38,66 ± 12,08 A	32,94 ± 9,48 A	3,17 ± 0,59 A
ROG+C	34,41 ± 18,02 A	29,90 ± 6,49 A	3,00 ± 1,13 A
ROG	39,43 ± 14,20 A	34,83 ± 9,46 A	3,46 ± 0,87 A
CMs+C	35,47 ± 20,75 A	25,39 ± 15,40 AB	1,02 ± 0,44 B
C	22,03 ± 13,93 AB	12,88 ± 10,06 B	0,81 ± 0,67 B
Controle	9,96 ± 13,38 B	11,04 ± 13,93 B	0,54 ± 0,89 B

Médias seguidas de letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste ANOVA two-way ($p < 0,05$).

PR: preenchimento de tecido ósseo neoformado dentro das roscas do implante. CO: contato direto osso-implante. AF: área de novo osso formado na região fora das roscas do implante. ROG: regeneração óssea guiada. CMs: células derivadas da medula óssea. C: carreador.



Figura 10 – Fotomicrografias ilustrativas dos diferentes grupos experimentais: ROG+CMs+C (a), ROG+C (b), ROG (c), CMs+C (d), C (e) e Controle (f). Aumento Original 10X. ROG: regeneração óssea guiada. CMs: células derivadas da medula óssea. C: carreador.

6 - DISCUSSÃO

Embora a técnica de regeneração óssea guiada tenha sido extensivamente estudada em defeitos peri-implantares (Simion *et al.* 2001; Zitzmann *et al.* 2001; Casati *et al.*, 2002; Kim *et al.* 2002a, 2002b; de Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Gurgel *et al.*, 2008), esta abordagem terapêutica apresenta limitações para restaurar, de maneira previsível, o tecido ósseo ao redor de implantes dentais (Caplanis *et al.* 1997; Schliephake *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2003; Botticelli *et al.*, 2004a,b). Evidências têm demonstrado, no entanto, que novas estratégias regenerativas, baseadas na engenharia tecidual e no transplante de células derivadas da medula óssea, podem resultar em formação de tecido ósseo de maneira promissora em diferentes tipos de defeitos (Chen *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2003; 2004; 2008), incluindo defeitos peri-implantares (Yamada *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009). Tendo em vista as evidências relacionadas à terapia celular e considerando os aspectos positivos do uso de barreiras durante o processo de regeneração óssea, tais como a capacidade de criação e de manutenção do espaço na área do defeito e habilidade na proteção mecânica da região a ser regenerada, o objetivo deste estudo foi avaliar o reparo em defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência tratados com uma abordagem combinada associando células derivadas da medula óssea e regeneração óssea guiada. Os resultados do presente estudo mostraram que, embora o uso de barreiras, associado ou não à presença de CMs, tenha resultado em superior formação de tecido ósseo na região fora das roscas do implante, as células derivadas da medula óssea, utilizadas isoladamente, foram capazes de promover bons resultados em termos de regeneração óssea dentro das roscas do implante nos defeitos peri-implantares.

Inúmeras investigações têm demonstrado o potencial terapêutico das células derivadas da medula óssea na regeneração de diversos tipos de defeitos ósseos presentes na mandíbula, tíbia e calvária (De Volk *et al.*, 2003; Abukawa *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005; Marei *et al.*, 2005; Srouji & Livine, 2005). Porém, o uso de CMs e avaliações de seus efeitos sobre a regeneração do tecido ósseo associada à implantodontia têm sido pouco investigados. Embora não haja estudos avaliando de maneira controlada o papel do transplante de células derivadas da medula óssea na regeneração ao redor de implantes dentais, algumas investigações têm relatado que o uso desta abordagem terapêutica é capaz de promover resultados promissores na formação óssea peri-implantar (Yamada *et al.*, 2004, 2008; Ueda *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009). No entanto, nenhum estudo avaliou se a abordagem combinada associando terapia celular e ROG poderia trazer benefícios em termos de

regeneração óssea em defeitos peri-implantares, quando comparada ao uso isolado de cada modalidade regenerativa. Deste modo, o presente estudo foi o primeiro a avaliar, de forma controlada, o reparo em defeitos ósseos peri-implantares do tipo deiscência tratados com a associação de células derivadas da medula óssea e da técnica de regeneração óssea guiada.

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações histométricas do presente estudo, todas as estratégias terapêuticas avaliadas que envolveram o uso de membrana ou de células derivadas da medula óssea apresentaram um bom padrão de formação óssea dentro dos limites das roscas do implante, quando comparadas aos defeitos não tratados. A terapia com CMs, utilizada isoladamente, foi capaz de promover formação óssea na região avaliada dentro das roscas do implante, de maneira comparável à obtida nos defeitos tratados com barreira, associados ou não à presença de CMs e/ou carreador. Em geral, o padrão de preenchimento ósseo e de contato osso-implante obtido pelas abordagens regenerativas do presente estudo está de acordo com trabalhos prévios que investigaram o reparo ósseo peri-implantar em diversos tipos de defeitos (Hockers *et al.*, 1999; Conner *et al.*, 2003; Veis *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009), incluindo defeitos do tipo deiscência (Casati *et al.*, 2002; Hanisch *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; de Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007), seguindo o tratamento com barreiras, enxertos ósseos autógenos e xenógenos, aplicação de proteína morfogenética recombinante humana-2, uso do transplante celular ou combinação destas estratégias regenerativas. Segundo alguns autores, o contato direto osso-implante e o volume de preenchimento ósseo obtidos nos limites das roscas são importantes para a manutenção clínica em longo prazo dos implantes dentais (Buser *et al.* 1991; Gotfredsen *et al.* 1995; Lazzara *et al.* 1999). Deste modo, considerando os bons resultados obtidos pelo uso isolado de CMs na formação óssea dentro da região das roscas do implante, pode-se sugerir que a aplicação da terapia celular, sem a necessidade do uso combinado da ROG, poderia apresentar aspectos positivos, minimizando problemas técnicos associados ao manuseio e adequada estabilização da membrana e evitando complicações relacionadas à deiscência do retalho, exposição da barreira e possível contaminação, o que pode, em alguns casos, prejudicar o processo de regeneração óssea (Simion *et al.*, 1994; Mellonig & Nevins, 1995; Nowzari & Slots, 1995; Cho *et al.*, 1998; Jovanovic *et al.*, 2007).

Embora as avaliações do presente estudo tenham revelado resultados positivos relacionados à terapia celular para os parâmetros avaliados dentro dos limites das roscas do implante, foi demonstrado que a técnica da ROG parece ser importante para a neoformação óssea

na região fora das roscas do implante. Desta forma, os resultados do presente estudo referentes à área de osso formado na região fora das roscas demonstrou que o uso de membranas proporcionou maior extensão de neoformação óssea. Embora diferenças entre investigações possam estar relacionadas a variações no tamanho dos defeitos ósseos, diferentes períodos de avaliação ou uso de diferentes superfícies de implante, no presente estudo o padrão de neoformação óssea na região fora das roscas do implante obtido pelos grupos tratados com barreira está de acordo com os achados de outros trabalhos que avaliaram o reparo ósseo peri-implantar em defeitos de deiscência tratados por meio da utilização da técnica da ROG (Cho *et al.*, 1998; de Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2007). A estabilidade do carreador dentro da região do defeito pode ser sugerida como um pré-requisito para a regeneração óssea peri-implantar (Barboza *et al.*, 2000). Sendo assim, de acordo com os resultados do presente estudo, pode ser especulado que, nos defeitos tratados com a terapia celular sem o uso da ROG, a ausência de uma proteção física como a barreira pode ter influenciado negativamente os resultados de formação óssea na região fora das roscas do implante, nos defeitos tratados com a terapia celular isoladamente. Neste contexto, poderia ser sugerido que as membranas teriam um papel protetor, auxiliando na manutenção da estabilidade do carreador semeado com células dentro da região do defeito. Vale ressaltar que, nos defeitos tratados com as células derivadas da medula sem a utilização de barreiras para a manutenção do espaço, as características anatômicas dos defeitos de deiscência do presente estudo poderiam favorecer a pressão dos tecidos moles adjacentes à área do defeito ósseo, dificultando a formação óssea na região fora das roscas do implante e prejudicando, deste modo, o potencial regenerativo da terapia celular, quando empregada sem o uso associado ROG.

No presente estudo, embora pudesse ser esperado um efeito adicional no reparo ósseo quando a abordagem terapêutica combinada (ROG + terapia celular) foi utilizada, os resultados demonstraram que a combinação destas estratégias regenerativas não foi capaz de resultar em maior formação óssea peri-implantar, em comparação com os resultados obtidos com o uso isolado da barreira ou em combinação com o carreador sem células. Mellonig & Nevins (1995) relataram que os defeitos ósseos tipo deiscência podem ser divididos em defeitos com características que favorecem a manutenção de espaço (*spacemaking*) ou que não favorecem (*non-spacemaking*). De acordo com estes autores, defeitos que favorecem a manutenção de espaço poderiam ser tratados com a utilização de barreiras, não requerendo, necessariamente, a utilização de materiais de

preenchimento (como enxertos ósseos autógenos, heterógenos, substitutos ósseos ou outros biomateriais). Ao contrário, em defeitos que não favorecem a manutenção do espaço, seria necessária a utilização de materiais de preenchimento, permitindo a criação e manutenção de espaço e evitando o colapamento da membrana sobre o implante. O tipo de defeito peri-implantar utilizado no presente estudo representa um defeito ósseo de deiscência de três paredes, cujos implantes permaneceram localizados dentro do tecido ósseo em relação à parede vestibular do osso alveolar, permitindo a manutenção de um espaço sob a membrana. Pode ser sugerido que esta característica anatômica do defeito avaliado no presente estudo tenha favorecido a obtenção de bons resultados nos defeitos tratados apenas com a utilização da barreira, sem que efeitos adicionais na formação óssea pudessem ser observados quando a abordagem terapêutica combinada (ROG + terapia celular) foi utilizada. Embora Kim *et al.* (2009) tenham demonstrado o potencial da terapia celular em associação com o uso de barreiras na regeneração ao redor de implantes, não existem estudos que tenham comparado o papel da abordagem terapêutica combinada com o efeito do uso isolado de barreiras e o potencial da aplicação isolada da terapia celular, no reparo ósseo peri-implantar, como realizado pelo presente estudo. Desta forma, pesquisas adicionais devem ser realizadas a fim de confirmar os achados do presente estudo.

Um aspecto relevante do presente estudo está relacionado à cautela em adequadamente isolar as células provenientes da medula óssea utilizadas nos defeitos ósseos e caracterizá-las fenotipicamente. Deste modo, o potencial osteogênico das CMs estudadas neste trabalho foi confirmado por meio da expressão de marcadores ósseos importantes - COL I, ALP e BSP - e pela habilidade das CMs produzirem nódulos minerais, suportando a interpretação de que as células utilizadas no presente experimento estavam comprometidas com o fenótipo osteogênico (Lian & Stein, 1992). De acordo com o contexto organizacional do tecido ósseo, a expressão de colágeno tipo I está associada à formação de matriz extracelular, a presença de fosfatase alcalina está envolvida com a maturação desta matriz e deposição organizada de minerais, enquanto a expressão de sialoproteína óssea está relacionada à mineralização da matriz extracelular (Lian & Stein, 1992). A co-expressão destes marcadores, como detectada nos resultados *in vitro* do presente estudo, sugere, portanto, o desenvolvimento de uma matriz extracelular mineralizada, refletindo a aquisição de propriedades osteogênicas pelas células estudadas. Adicionalmente, uma vez que a mineralização é considerada um indicativo *in vitro* importante da diferenciação celular, a

detecção de fosfato presente nos depósitos minerais, por meio da avaliação de Von kossa, no presente estudo, também confirma o comprometimento osteogênico das células derivadas da medula óssea utilizadas nos experimentos.

Além disso, sabe-se que a medula óssea é composta por tipos celulares heterogêneos, os quais, se utilizados como um todo, podem ter impacto negativo sobre a osteogênese. Tendo em vista que as células mesenquimais indiferenciadas representam apenas uma pequena fração do total de células obtidas a partir da medula óssea, para a obtenção de uma população celular mais homogênea, no presente estudo, as amostras de medula óssea foram submetidas a um fracionamento por gradiente de densidade, a fim de eliminar células indesejáveis presentes na composição da medula coletada, isolando, desta maneira, as células mononucleares com potencial para serem utilizadas na terapia celular (Kern *et al.*, 2006). De acordo, uma investigação recente demonstrou a eficácia do método de separação celular por meio de gradientes de densidade utilizando solução de Ficoll, como realizado no presente estudo, para isolar as células mesenquimais indiferenciadas (Chang *et al.*, 2009). A composição da solução de Ficoll é responsável pela formação de um meio com baixa viscosidade e alta densidade e o princípio da técnica de separação celular baseia-se na densidade do gradiente da solução em relação aos tipos celulares, resultando na formação de camadas contendo diferentes células: a fração celular, constituída de eritrócitos e granulócitos, atravessa o gradiente e se sedimenta no fundo dos tubo, enquanto as células mononucleares não conseguem penetrar pelo gradiente, depositando-se na interface entre o Ficoll e o plasma, formando a camada celular com potencial para ser utilizada nos experimentos subsequentes. Baseado nestes aspectos, pode-se sugerir que a população de CMs utilizadas na terapia celular do presente estudo foram adequadamente isoladas e caracterizadas quanto ao fenótipo osteogênico antes de serem transplantadas nos defeitos, diferentemente de outros trabalhos que utilizaram a medula óssea como um todo, sem realizar a separação das células mesenquimais indiferenciadas ou sem demonstrar *in vitro* o comprometimento osteogênico destas células (Yamada *et al.*, 2004, 2008; Ueda *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009).

Embora a medula óssea seja uma das principais fontes de células estudada para aplicação na engenharia tecidual e regeneração óssea (Bruder *et al.*, 1998; Fibbe, 2002; Kawaguchi *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2005), sabe-se que células mesenquimais com potencial osteogênico podem ser obtidas a partir de outros tecidos, como, por exemplo, o periósteo

(Zhu *et al.*, 2006; Agata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). Deste modo, outras investigações devem ser consideradas a fim de determinar o papel de outras fontes de células mesenquimais para a regeneração óssea peri-implantar.

De forma geral, os resultados do presente estudo mostraram que as células derivadas da medula óssea podem promover formação óssea na região dentro das roscas do implante comparável à obtida pelo uso de membranas, em combinação ou não com CMs e/ou carreador. Porém, o uso de barreiras parece ser relevante na formação óssea na região fora das roscas do implante. Deve ser ressaltado, no entanto, que complicações podem, eventualmente, estar associadas ao uso da ROG em casos de exposição da membrana, prejudicando os resultados da terapia regenerativa (Cho *et al.*, 1998; Jovanovic *et al.*, 2007). Mais estudos devem ser considerados, a fim de estabelecer a previsibilidade em longo prazo da regeneração óssea peri-implantar promovida pela terapia celular. Adicionalmente, outras investigações devem ser realizadas com o objetivo de verificar se o uso de superfícies de implante modificadas poderia otimizar os resultados obtidos pela terapia celular e ainda, se outras fontes de células mesenquimais indiferenciadas promoveriam respostas diferentes das células derivadas da medula óssea na regeneração de defeitos peri-implantares.

7- CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que as células derivadas da medula óssea, utilizadas isoladamente, promoveram bons resultados na formação óssea dentro das roscas do implante, embora o seu uso, associado à ROG, não tenha sido capaz de promover benefícios adicionais na formação óssea em defeitos peri-implantares de deiscência.

REFERÊNCIAS *

1. Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(5): 601-6.
2. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(1): 94-100.
3. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, *et al.* Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J Dent Res.* 2007; 86(1): 79-83.
4. Barboza EP, Duarte ME, Geolás L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjö UM. Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol.* 2000; 71(3): 488-96.
5. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(4): 568-84.
6. Becker W, Becker BE, Handlesman M, Celletti R, Ochsenbein C, Hardwick R, *et al.* Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1990; 10(2): 92-101.
7. Bertram H, Mayer H, Schliephake H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and *in vitro* processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(5): 524-31.
8. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. Appositional bone formation in marginal defects at implants *Clin Oral Impl Res.* 2003a; 14(1): 1-9.
9. Botticelli D, Berglundh T, Buser D, Lindhe J. The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2003b; 14(1): 35-42.
10. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1998; 16(2): 155-62.
11. Buser D, Dula K, Hess D *et al.* Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000 1999; 19: 151-63.
12. Buser D, Ruskin J, Higginbottom F, Hardwick R, Dahlin C, Schenk R. Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects. A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(6): 666-81.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

13. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25(7): 889-902.
14. Caplanis N, Sigurdsson TJ, Rohrer MD, Wikesjö UM. Effect of allogeneic, freeze-dried, demineralized bone matrix on guided bone regeneration in supra-alveolar peri-implant defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12 (5): 634-42.
15. Casati MZ, Sallum EA, Nociti FHJr, Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2002; 73(7): 789-96.
16. Casati MZ, de Vasconcelos Gurgel BC, Gonçalves PF, Pimentel SP, da Rocha Nogueira filho G, Nociti FH Jr, *et al.* Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects--a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36(2):132-36.
17. Castano-Izquierdo H, Álvarez-Barreto J, van den Dolber J, Jansen JA, Mikos AG, Sikavitsas VI. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. *J Biomedical Materials Res.* 2007; 82(1):129-38.
18. Chen F, Chen S, Tao K, Feng X, Liu Y, Lei D, *et al.* Marrow-derived osteoblasts seeded into porous natural coral to prefabricate a vascularised bone graft in the shape of a human mandibular ramus: Experimental study in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 42(6): 532-7.
19. Chen F, Mao T, Tao K, Chen S, Ding G, Gu X. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(10): 1155-59.
20. Chen F, Mao T, Tao K, Chen S, Ding G, Gu X. Injectable bone. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 41(4): 240-3.
21. Chen F, Ouyang H, Feng X, Gao Z, Yang Y, Zou X, *et al.* Anchoring dental implant in tissue-engineered bone using composite scaffold: a preliminary study in nude mouse model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(5): 586-91.
22. Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of percoll and ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J.* 2009; 32 (3): 264-75.
23. Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20 Suppl 4:113-23.
24. Cho KS, Choi SH, Han KH, Chai JK, Wikesjö UM, Kim CK. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(6): 419-28.

25. Conner KA, Sabatini R, Mealey BL, Takacs VJ, Mills MP, Cochran DL. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched, and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol.* 2003; 74(5): 658-68.
26. Dahlin C, Lekholm U, Becker W, Becker B, Higuchi K, Callens A, *et al.* Treatment of fenestration and dehiscence bone defects around oral implants using the guided tissue regeneration technique: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(3): 312-8.
27. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989; 4(1): 19-25.
28. De Kok IJ, Drapeau SJ, Young R, Cooper LF. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20(4): 511-8.
29. de Vasconcelos Gurgel BC, Gonçalves PF, Pimentel SP, Ambrosano GM, Nociti Junior FH, Sallum EA, *et al.* Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(5):649-54.
30. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11(4):318-26.
31. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological Factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(3): 721-64.
32. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61 Suppl 2: ii29-31.
33. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16(3): 381-90.
34. Gottfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29(10): 1223-31.
35. Gurgel BC, Gonçalves PF, Pimentel SP, Nociti FH, Sallum EA, Sallum AW, *et al.* An oxidized implant surface may improve bone-to-implant contact in pristine bone and bone defects treated with guided bone regeneration: an experimental study in dogs. *J Periodontol.* 2008; 79(7): 1225-31.
36. Hammerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000. 2003;33:36-53.
37. Hammerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000 1998; 17: 151-75.

38. Hanisch O, Sorensen RG, Kinoshita A, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjö UM. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dehiscence defects with non-submerged immediate implants: an experimental study in Cynomolgus monkeys. *J Periodontol*. 2003; 74(5): 648-57.
39. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int*. 2008; 82(3): 238-47.
40. Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CH. 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 Implants Res*. 1999; 10(6): 487-98.
41. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 73(1): 63-72.
42. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, Spiekermann H, Wozney JM, Wikesjö UM. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(2): 224-30.
43. Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(1): 23-31.
44. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7(2): 233-45.
45. Jovanovic AS. Diagnosis and treatment of peri-implant disease. *Curr Opin Periodontol*. 1994: 194-204.
46. Kadiyala S, Young RG, Theide MA, Bruder S. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997; 6(2): 125-34.
47. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, *et al*. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004; 75(9): 1281-7.
48. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-301.
49. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin – plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002a; 17(1): 86-94.
50. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*.

2002b; 60(9): 1018-25.

51. Kim SH, Kim KH, Seo BM, Koo KT, Kim T, Seol YJ, *et al.* Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in canine peri-implant defects model: A pilot study. *J Periodontology*. 2009 (in press).
52. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*. 2004; 28(1): 33-9.
53. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*. 2006; 35(3): 232-42.
54. Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histological analysis of osseotites and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J Periodontics and Restorative Dent*. 1999; 19: 117-29.
55. Li H, Yan F, Lei L, Li Y, Xiao Y. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. *Cells Tissues Organs*. 2009; 190(2): 94-101.
56. Lian JB, Stein GS. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3(3): 269-305.
57. Lima LA, Fuchs-Wehrle AM, Lang NP, Hämmerle CH, Liberti E, Pompeu E, *et al.* Surface characteristics of implants influence their bone integration after simultaneous placement of implant and GBR membrane. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14 (6): 669-79.
58. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 1996; 7(4): 329-36. Erratum in: *Clin Oral Implants Res*. 1997; 8(4): 342.
59. Marei MK, Nouh SR, Saad MM, Ismail NS. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. *Tissue Eng*. 2005; 11(5-6): 751-67.
60. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976; 47(5): 256-60.
61. Mellonig JT, Nevins M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995; 15(2): 168-85.
62. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(8): 881-7.
63. Mizuno D, Kagami H, Mizuno H, Mase J, Usami K, Ueda M. Bone regeneration of dental implant dehiscence defects using a cultured periosteum membrane. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(3): 289-94.

64. Naert I, Koutsikakis G, Duyck J, Quirynen M, Jacobs R, Van Steenberghe D. Biologic outcome of single-implant restorations as tooth replacements: A long-term follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2000; 2(4): 209-18.
65. Nowzari H, Slots J. Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(1): 67-73.
66. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(1): 80-90.
67. Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16(5): 622-9.
68. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1998; 136: 42-60.
69. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, *et al.* Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(6): 539-46.
70. Pittenger MF, Mackay AM, Beck CB, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
71. Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl): 203-15.
72. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11(3): 230-41.
73. Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Schmitz L, Engelhardt E, *et al.* Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36(12): 1198-206.
74. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994; 14(2): 166-80.
75. Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(1): 35-45.
76. Srouji S, Livne E. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126(2): 281-7.

77. Stentz WC, Mealey BL, Gunsolley JC, Waldrop TC. Effects of guided bone regeneration around commercially pure titanium and hydroxyapatite-coated dental implants. II. Histologic analysis. *J Periodontol*. 1997; 68(10): 933-49.
78. Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, Okazaki Y. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2005; 25(2): 129-37.
79. Veis AA, Papadimitriou S, Trisi P, Tsirlis AT, Parissis NA, Kenealy JN. Osseointegration of Osseotites and machined-surfaced titanium implants in membrane-covered critical-sized defects: a histologic and histometric study in dogs. *Clin Oral Impl Res*. 2007; 18(2): 153-60.
80. Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, *et al*. Space-providing expanded polytetrafluoroethylene devices define alveolar augmentation at dental implants induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an absorbable collagen sponge carrier. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5(2): 112-23.
81. Wikesjo UM, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, *et al*. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(2):194-204.
82. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, *et al*. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003; 31(1): 27-33.
83. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, *et al*. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(10): 1699-707.
84. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(5): 589-97.
85. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007; 327(3): 449-62.
86. Zablotsky M, Meffert R, Caudill R, Evans G. Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehisced hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991; 6(3): 294-303.
87. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(2):164-9.
88. Zitzman NU, Scharer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16(3): 255-366.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEIB-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEIB-IB-UNICAMP**

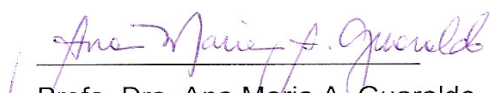
C E R T I F I C A D O

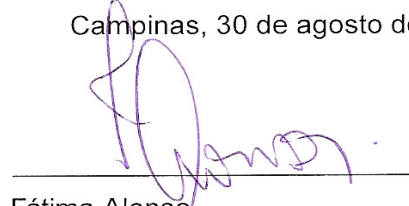
Certificamos que o Protocolo nº **1088-1**, sobre **"EFEITO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA E DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA SOBRE O REPARO ÓSSEO AO REDOR DE IMPLANTES EM DEFEITOS PERIIMPLANTARES. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO EM CÃES"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati / Fernanda Vieira Ribeiro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEIB)-IB-UNICAMP em 30 de agosto de 2006.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1088-1**, entitled **"EFFECT OF MARROW-DERIVED MESENCHYMAL CELLS AND OF GUIDED BONE REGENERATION OF BONE DEFECTS ON BONE HEALING AROUND IMPLANTS IN PERI-IMPLANT DEFECTS. A HOSTOMORPHOMETRIC STUDY IN DOGS"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 30, 2006.

Campinas, 30 de agosto de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Gueraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEIB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemib.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>