



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**JÚLIO DE MESQUITA FILHO**

**UNESP**

**Ryane Schmidt Brock**

**RETALHO ÓSSEO NEO-FABRICADO DE GÁLEA E  
PERIÓSTEO PREENCHIDO COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS, PLASMA RICO EM PLAQUETAS, PÓ DE  
OSSO E ÁCIDO HIALURÔNICO.  
ESTUDO EM COELHO.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade Estadual Paulista UNESP –  
Botucatu, para obtenção do título de Doutora  
em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**JÚLIO DE MESQUITA FILHO**

**UNESP**

RETALHO ÓSSEO NEO-FABRICADO DE GÁLEA E PERIÓSTEO  
PREENCHIDO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, PLASMA RICO  
EM PLAQUETAS, PÓ DE OSSO E ÁCIDO HIALURÔNICO.  
ESTUDO EM COELHO.

OSSEOUS FLAP OF GALEA AND PERIOSTEUM FILLED WITH  
MESENCHYMAL STEM CELLS, PLATELET RICH PLASMA, BONE DUST AND  
HYALURONIC ACID. STUDY IN RABBITS.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade Estadual Paulista UNESP – Botucatu

Área de concentração: Bases da Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto

Professor Livre-docente e Responsável pela Disciplina de  
Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu –  
UNESP.

Co-orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Doutora e Professora Assistente da Disciplina de Hemoterapia  
da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP.

Autora:

Ryane Schmidt Brock

Especialista pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica.  
Mestre em Bases da cirurgia pela Faculdade de Medicina de  
Botucatu – UNESP.

**Botucatu**

**2017**

Ryane Schmidt Brock

RETALHO ÓSSEO NEO-FABRICADO DE GÁLEA E PERIÓSTEO  
PREENCHIDO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, PLASMA RICO  
EM PLAQUETAS, PÓ DE OSSO E ÁCIDO HIALURÔNICO.  
ESTUDO EM COELHO.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto  
Professor Livre-docente e Responsável pela Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aristides Augusto Palhares Neto

Prof. Dr. Jorge Miguel Psillakis

Prof. Dr. Max Domingues Pereira

Prof. Dr. Paulo Kharmandayan

Catálogo na Publicação  
Serviço de documentação  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Brock, Ryane Schmidt

Retalho ósseo neo-fabricado de gálea e periósteo preenchido com células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas, pó de osso e ácido hialurônico. Estudo em coelho.

Osseous flap of galea and periosteum filled with mesenchymal stem cells, platelet rich plasma, bone dust and hyaluronic acid. Study in rabbits.

Botucatu, 2017.

Dissertação (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia)

Área de concentração: Bases da Cirurgia

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

1. Osso. 2. Calvária. 3. Malformação craniofacial. 4. Retalho. 5. Face. 6. Células-tronco mesenquimais. 7. Plasma rico em plaquetas. 8. Ácido hialurônico. 9. Coelho.



# Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais  
Roger Brock e Emmy Schmidt Brock  
que sempre me deram apoio e compreensão em todos os meus objetivos e  
caminhos percorridos.  
E os tenho como exemplo de respeito, ética, perseverança e trabalho que vou  
respeitar e seguir sempre.

Dedico também aos meus irmãos  
Romy Schmidt Brock Zacharias e Roger Schmidt Brock  
pelo companheirismo e amizade fundamentais para esta trajetória.



# Agradecimentos

Agradeço ao  
Prof. Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto,  
meu orientador,  
pelo incentivo, apoio e confiança sempre presentes e fundamentais para realização  
e conclusão deste trabalho.

Agradeço a  
Profa. Dra. Elenice Deffune,  
minha co-orientadora, pelo apoio e ensinamentos fundamentais para este trabalho.



## Agradecimentos

À Dra Maria Aparecida Custodio Domingues, professora e responsável pelo departamento de patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista - UNESP, pela atenção, ensinamentos e auxílio fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia e Ortopedia pelo auxílio e dedicação aos alunos e aos animais do biotério.

Cuidados e atenção essenciais para o sucesso dos trabalhos científicos.

À Profa. Maria Jaqueline Mamprim, responsável pelo Serviço de Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP, que contribuiu para a realização dos exames radiográficos necessários para a análise dos resultados.

Aos residentes e funcionários do Departamento de Radiologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP pela receptividade e auxílio durante os exames de imagem dos animais estudados.

A Eloisa Elena Paschoalinotte pela atenção e contribuição na análise estatística.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1. Introdução .....	1
2. Objetivo .....	8
3. Métodos .....	9
3.1 Subdivisões dos grupos.....	10
3.2 Preparo das células-tronco mesenquimais .....	16
3.3 Preparo do plasma rico em plaquetas.....	21
3.4 Métodos de avaliação .....	24
3.4.1. Avaliação por imagem.....	24
3.4.2. Avaliação histológica .....	25
3.4.3. Critérios histológicos .....	27
3.5 Análise estatística.....	27
4. Resultados .....	29
4.1. Células-tronco mesenquimais .....	30
4.2. Exames de imagem .....	36
4.3. Avaliação histológica .....	45
5. Discussão .....	69
5.1 Retalho de gálea e periósteo .....	69
5.2 Plasma rico em plaquetas.....	70
5.3 Células-tronco mesenquimais adultas do tecido adiposo.....	72
5.4 Ácido hialurônico.....	73

5.5 Análise de imagem.....	74
5.6 Formação óssea.....	76
6. Conclusão .....	80
7. Referências bibliográficas .....	81
8. Artigo .....	89
9. Anexos .....	113

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos:

% - porcentagem

Acetona PA – Acetona para análise.

ADP – adenosina difosfato

Angp 2 – angiopoetina 2

ATP – adenosina trifosfato

BMP - proteína óssea morfogenética (bone morphogenic protein)

Capela de fluxo laminar Classe IIA - Fluxo Laminar de Ar vertical com tiro frontal de ar de 75 pés/min. Recomendada para trabalho com agentes de risco biológico dos grupos 1 e 2.

Contraste de fase - aplicável indivíduos transparentes, como células vivas em cultura, revela a estrutura que não é visível na imagem de campo claro.

CTM –TA – célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo

DMEM/F-12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF – Fator de crescimento epidérmico

Escala HU - unidade Hounsfield

FGF - fator de crescimento de fibroblasto

g – gravidade, expressa a força centrífuga ("g") gerada, proporcional à velocidade de rotação do rotor (rotações por minuto - RPM) e à distância entre o centro do rotor e o tubo de centrifuga.

HE – Hematoxilina-eosina

Hedgehog - família de proteínas mediadoras do desenvolvimento de vertebrados

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid)

Kg – quilograma

Mg – miligrama

Milli-Q ou água Milli-Q - é uma água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation. A pureza da água é monitorada pela medida da condutividade. Importante para muitas aplicações químicas de quantificação sem a influência de impurezas. A qualidade da água deionizada pode ser detectada através da resistência em condições bem definidas. A alta resistência é obtida pela perda de íons que funcionam como carreadores de carga. Valor de resistividade maior que 18,2 MΩ cm a 25 °C é desejável.

mm – milímetro

°C – grau Celsius

OP – 1 - proteína osteogênica-1

PAI I - inibidor I do ativador de plasminogênio

PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta (platelet derived growth factor)

PRP – plasma rico em plaquetas

RANTES – proteína celular regulada por células T (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)

rpm – rotações por minuto

SFB - soro fetal bovino

T25 - frascos de cultura para células aderentes ao plástico de 25 mm<sup>2</sup>

TA – tecido adiposo

TGF- $\beta$  - fator de transmissão do crescimento beta

UNESP – Universidade Estadual Paulista

VEGF - fator de crescimento endotelial

Wnt – via de sinalização intracelular associada à proliferação celular

$\mu$ L – microlitro

## Lista de figuras:

- Figura 1: Preparo e marcação da incisão em região cefálica superior após tricotomia e infiltração local com lidocaína para diminuir o estímulo doloroso do procedimento ao animal..... 10
- Figura 2: A - Incisão cefálica mediana, B - dissecação de retalhos cutâneos laterais até exposição da gálea, C - retalho gáleo-periostal de metade da calota craniana elevado por descolamento..... 11
- Figura 3: A – Raspagem da calota craniana com lâmina de bisturi nº 23 para retirar o pó de osso, após levantamento de retalho gáleo-periostal. B – Fragmentos de osso da calota craniana pesado e utilizado no preenchimento do retalho tubular do Grupo 3. C – Após término do preenchimento de retalho unilateral o outro lado do tecido gáleo-periostal também foi elevado para a confecção retalho tubular contralateral vazio pertencente ao Grupo 4.....12
- Figura 4: O pó de osso foi pesado em balança de alta precisão.....12
- Figura 5: A - Após a confecção do retalho tubular e sutura, a extremidade do retalho é fixado na gálea da região anterior da calota craniana. B - Imagem final após o término da confecção dos retalhos bilaterais fixados no periósteo anterior. À direita, pertencente ao Grupo 3 e à esquerda, pertencente ao Grupo 4.....13
- Figura 6: Pérolas de PRP preparadas e separadas para transporte até o laboratório onde é realizado o procedimento cirúrgico. O transporte deste material é feito em isopor com gelo para manter a temperatura aproximada a 4°C.....13
- Figura 7: Pérola de PRP associado com célula-tronco mesenquimal autógena, preparada e identificada para cada coelho. Visão lateral da pérola preparada em laboratório.....14
- Figura 8: A - Após a confecção do retalho tubular à direita pertencente ao Grupo 9, sutura do retalho tubular à esquerda pertencente ao Grupo 10. B - Introdução da pérola de PRP com células-tronco mesenquimais após inclusão do pó de osso no retalho do Grupo 10.....15
- Figura 9: Seqüência do procedimento para retirada de tecido adiposo dorsal. A – Coelho na posição ventral com a região dorsal tricotomizada. B – Marcação da incisão a ser realizada. C – Incisão de aproximadamente 2 cm em região dorsal do coelho. D – Identificação e dissecação do tecido adiposo dorsal. E – Retirada de tecido adiposo e F – pesagem do tecido total retirado do animal.....17

Figura 10: A – Tecido adiposo ressecado do dorso do coelho. B – Material ressecado e inserido em tubo Falcon em meio de cultura com antibiótico. C – Tubos identificados e protegidos para envio ao laboratório.....	18
Figura 11: Câmara de fluxo laminar vertical utilizado para a manipulação celular, evitando a contaminação.....	18
Figura 12: Centrifugação dos tubos por 10 minutos a 1200 rpm (950 g).....	19
Figura 13: Aparelho de banho-maria para descongelamento celular.....	21
Figura 14: Radiografias de controle nas incidências: lateral, ântero-posterior e dorso-ventral.....	24
Figura 15: Tomografia computadorizada da Faculdade de Veterinária da UNESP, onde foram realizados os exames tomográficos de crânio dos coelhos estudados. Os animais foram anestesiados e posicionados sobre um suporte em posição ventral.....	25
Figura 16: Retalho tubular ressecado após anestesia do coelho. Foi mantido íntegro e enviado para análise anátomo-patológica para evitar perda do tecido ósseo no interior.....	26
Figura 17: O material foi mantido em frascos com formol tamponado 10% e identificados.....	26
Figura 18: A - As peças em formol no laboratório, B - preparadas e identificadas em cassetes para o preparo da parafina. C – linha vermelha indicando o corte longitudinal das peças para análise histológica.....	26
Figura 19: Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo após terceira passagem com marcadores CD45, CD11b, CD44 e CD90. A Citometria de Fluxo faz distinção das células por tamanho e complexidade, com a seleção das células linfomononucleares a serem analisadas.....	30
Figura 20: Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo após terceira passagem com marcadores CD45, CD11b, CD44 e CD90. Leitura do tubo controle para determinação da imunofluorescência de base.....	32
Figura 21: Resultado com CD45 com células de terceira passagem.....	32
Figura 22: Resultado com CD11b com células de terceira passagem.....	33
Figura 23: Resultado com CD90 com células de terceira passagem.....	33
Figura 24: Resultado com CD44 com células de terceira passagem.....	33

Figura 25: Teste de Imunofluorescência clássica com marcadores CD45 e CD90 pré-plaqueamento e após a terceira passagem. A – CD45 pré plaqueamento, B – CD45 após a terceira passagem, C – CD90 pré plaqueamento, D – CD 90 após a terceira passagem.....	34
Figura 26: Fotomicrografia da cultura e diferenciação de CTM. A - teste de aderência ao plástico, aspecto de colônia de células fibroblastóides observadas por microscopia invertida de contraste de fase (aumento 20x). B - controle negativo não diferenciado, corado com Hematoxilina-eosina. C - diferenciação adipogênica corada com Oil Red onde se observam os depósitos de lipídeos em grânulos alaranjados. D - diferenciação osteogênica corado com Alizarin Red observando as deposições de cálcio e formação das trabéculas ósseas representadas em vermelho. E - diferenciação em vasos sanguíneos, corado com Hematoxilina-eosina.....	35
Figura 27: Raio-X em incidência lateral com imagem considerada positiva pelos dois avaliadores em região superior da calota craniana, A - correspondente ao coelho 8, que continha o Grupos 7 à direita e o Grupo 8 à esquerda. B – coelho 4, que continha o Grupo 9 à direita e o Grupo 10 à esquerda.....	37
Figura 28: Raio-X dorso-ventral considerado pelos avaliadores como positivo para a imagem hiperdensa em lado direito de calota craniana, correspondente ao coelho 6 – Grupo 7. A letra R corresponde ao lado direito do animal.....	39
Figura 29: Raio-X na incidência ântero-posterior considerada positiva pelos avaliadores. A – imagem puntiforme em porção superior da calota craniana, lado direito evidenciada pelo retângulo vermelho. B – Área do retângulo em maior aumento, evidenciando a imagem hiperdensa em região cranial direita.....	39
Figura 30: Imagem coronal de tomografia de crânio do coelho 4 – Grupos 9 e 10, ausência de imagem que evidencie formação óssea em região cranial da calota craniana.....	42
Figura 31: Corte coronal de tomografia computadorizada de crânio do coelho 8 – Grupos 7 e 8, com imagem em região cranial direita de calota craniana correspondente ao Grupo 7. ....	43
Figura 32: Tomografia computadorizada de crânio do coelho 4 – Grupos 9 e 10. A - imagem 3D de partes ósseas e B - imagem 3D de partes moles. ....	44

Figura 33: Tomografias computadorizadas em imagens tridimensionais do crânio dos coelhos. A – Coelho 88 (Grupos 11 e 12), sem deformidade da calota craniana. B – Coelho 55 (Grupos 1 e 2), depressão pequena e unilateral, mesmo sem manipulação óssea durante o ato operatório. C - Coelho 91 (Grupos 9 e 10), com depressão grande bilateralmente na calota craniana.....	44
Figura 34: Retalho de gálea e perióstio, corado com hematoxilina-eosina, demonstrando tecido adiposo (1), muscular (2) e vascularização tecidual (3) (10x).....	46
Figura 35: Coelho 10, Grupo 2 (10x). Imagem óssea neoformada com bordos irregulares, vascularização dentro da matriz óssea, osteócitos ao acaso, não organizados.....	47
Figura 36: A – Coelho 51, Grupo 3 (10x). Imagem irregular, osteócitos ao acaso (1) e vascularização interna (2). B – Coelho 14, Grupo 3. Formação óssea irregular, pequena, sem vascularização interna, poucos osteócitos ao acaso(3).....	48
Figura 37: A – Coelho 36, Grupo 4. Imagem da formação óssea pequena e irregular. B – Coelho 22, Grupo 4. Formação óssea irregular, estreita, pouco organizada (10x).....	50
Figura 38: A – Coelho 16, Grupo 5. B – Coelho 17, Grupo 5. Formações ósseas pequenas, irregulares com poucos osteócitos (10x).....	52
Figura 39: Coelhos 11, 15 e 17, respectivamente, pertencentes ao Grupo 6 (10x).....	54
Figura 40: Coelho 6, Grupo 7 (10x). Formação óssea com maior número de osteócitos (1) e osteoblastos na periferia (2).....	56
Figura 41: Coelho 58, Grupo 7 (10x). Estudo histológico do tecido ressecado da calota craniana, na coloração Tricrômio de Massom, demonstrando a forma regular, bem delimitada, envolta por osteoblastos (1), com osteócitos (2) e vasos no interior (3) e a coloração azulada que indica áreas de ossificação (4).....	56
Figura 42: A – Coelho 8, Grupo 8 (10x). Formação óssea com grande quantidade de osteócitos e forma irregular. B – Coelho 95, Grupo 8 na coloração Tricrômio de Massom com imagem bem organizada e delimitada, além da presença de ossificação.....	58

Figura 43: Coelho 5, Grupo 9. A – Formação óssea bem delimitada, organizada, com muitos osteócitos paralelos, lamelas paralelas (1), rima periférica de osteoblastos (2) (10x). B - Organização celular dos osteócitos (20x). C – Região periférica onde localizam-se osteoblastos (40x).....	60
Figura 44: Coelho 4, Grupo 10 (10x). Imagens do tecido ósseo formado. A - hematoxilina-eosina e B - Tricrômio de Massom. Verifica-se a formação óssea organizada, bem delimitada, com vascularização, osteócitos paralelos e ossificação central.....	62
Figura 45: Coelho 4, Grupo 10. Rima periférica de osteoblastos presentes no tecido ressecado (40x).....	63
Figura 46: Coelho 44, Grupo 10. Formação óssea seriada, regular, com calcificação e vascularização na matriz (10x).....	63
Figura 47: Coelho 55, Grupo 10 (5x). Imagens seriadas da formação óssea neoformada.....	64
Figura 48: A – Coelho 37, Grupo 11. B – Coelho 81, Grupo 11. Imagens da formação óssea com tecido ósseo pequeno, irregular com poucos osteócitos e sem osteoblastos (20x).....	65
Figura 49: Formações ósseas do tecido ressecado. A – Coelho 56, Grupo 12. B – Coelho 74, Grupo 12 (20x).....	66

## Lista de tabelas:

Tabela 1: Disposição e divisão dos grupos (n = número da amostra).....	16
Tabela 2: Valores de hematócrito, hemoglobina, glóbulos brancos e plaquetometria encontrados no sangue dos coelhos utilizados para preparo de PRP. Valores de referência: Hematócrito (Ht): 40% - 60%, Hemoglobina (Hb): 9,5 – 13 g/dl, Glóbulos Brancos (GB): 6.000 – 17.000, Plaquetas: 200 – 500 ( $\times 10^3$ ) <sup>81,82</sup> .....	22
Tabela 3: Dosagens dos fatores de crescimento no PRP.....	23
Tabela 4: Peso médio inicial dos coelhos nos grupos estudados. Os grupos estão divididos em pares por pertencerem ao mesmo animal.....	29
Tabela 5: Contagem celular e viabilidade dos animais dos Grupos 7, 8, 9 e 10. Avaliação por citometria de fluxo após a terceira passagem.....	31
Tabela 6: Comparação das médias dos valores dos resultados da citometria de fluxo dos marcadores CD45, CD11b, CD90, CD44 pré plaqueamento e após a terceira passagem.....	32
Tabela 7: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 30 dias de pós operatório, na incidência dorso-ventral e ântero-posterior, analisadas pelos avaliadores 1 e 2.....	36
Tabela 8: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 30 dias de pós operatório, na incidência lateral, analisadas pelos avaliadores 1 e 2.....	37
Tabela 9: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 60 dias de pós operatório, na incidência dorso-ventral e ântero-posterior analisadas pelos dois avaliadores.....	38
Tabela 10: Resultados obtidos nas imagens radiográficas após 60 dias de pós operatório, na incidência lateral, analisadas pelos avaliadores 1 e 2.....	40
Tabela 11: Resultado de imagens tomográficas em região cranial, cortes coronais, dividida entre os grupos estudados.....	42
Tabela 12: Avaliação semi-quantitativa dos avaliadores 1 e 2 quanto a presença de osteócitos, osteoblastos, vascularização, calcificação e organização celular em porcentagem.....	45

Tabela 13: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 2.....	47
Tabela 14: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 3.....	49
Tabela 15: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 4.....	51
Tabela 16: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 5.....	53
Tabela 17: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 6.....	55
Tabela 18: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 7.....	57
Tabela 19: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 8.....	59
Tabela 20: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 9.....	61
Tabela 21: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 10.....	64
Tabela 22: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 11.....	65
Tabela 23: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 12.....	66
Tabela 24: Média da área, perímetro e volume nos grupos que apresentaram formação óssea no estudo histológico. Em azul, as maiores medidas encontradas e em vermelho, as menores medidas.....	67

Lista de gráficos:

Gráfico 1: Comparação dos resultados positivos encontrados nas radiografias de crânio no pós operatório de 30 dias.....	41
Gráfico 2: Comparação dos resultados positivos encontrados nas radiografias de crânio no pós operatório de 60 dias.....	41
Gráfico 3: Análise das medidas de área com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.....	68
Gráfico 4: Análise das medidas de perímetro com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.....	68
Gráfico 5: Análise das medidas de volume com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.....	68

## Resumo:

As deformidades craniofaciais decorrentes de traumas, ressecções de tumores ou malformações congênitas são freqüentes na prática médica e o tratamento destas necessitam de cirurgia reparadora, com técnicas especializadas e profissionais qualificados para corrigir os defeitos e proporcionar melhor qualidade de vida, aprimorar a fala, respiração, mastigação e deglutição.

Há diversas técnicas descritas para corrigir os defeitos ósseos, cada uma com vantagens e desvantagens, escolhidas de acordo com o tipo de deformidade.

Este estudo avaliou a formação óssea em um retalho tubular vascularizado, gáleo-periostal, enriquecido com o uso de pó de osso, plasma rico em plaquetas, células-tronco mesenquimais e ácido hialurônico, em coelhos, que tenha capacidade de substituir o enxerto ósseo nas reconstruções, principalmente nos defeitos faciais.

No estudo, utilizou-se 98 coelhos divididos em doze grupos, submetidos à cirurgia para confecção do retalho em calota craniana. Foram realizados retalhos tubulares com o perióstio voltado para dentro e preenchidos com pó de osso, plasma rico em plaquetas (PRP), células-tronco mesenquimais (CTM) e ácido hialurônico. O Grupo 1 não foi manipulado. No Grupo 2 foi realizado o retalho tubular e mantido vazio. O Grupo 3 teve o retalho preenchido com pó de osso, no Grupo 4 o retalho foi mantido vazio. O Grupo 5 teve o retalho preenchido com PRP. No Grupo 6 o retalho foi preenchido com PRP e pó de osso. O Grupo 7 foi preenchido com CTM. O Grupo 8 teve o retalho preenchido com CTM e pó de osso. O Grupo 9 teve o retalho preenchido com CTM e PRP. No Grupo 10, o retalho tubular foi preenchido com PRP, CTM e pó de osso. O Grupo 11 foi mantido vazio e o Grupo 12 foi preenchido com ácido hialurônico.

Os resultados foram avaliados através de métodos de imagem e avaliação histológica.

Os resultados demonstraram que, no modelo experimental utilizado, os grupos com apenas perióstio, isto é, retalho tubular vazio, apresentaram formação óssea pequena e irregular. No grupo com PRP também houve a formação óssea irregular e imatura. Quando o PRP foi associado ao pó de osso houve uma formação mais regular e organizada.

O grupo com célula-tronco mesenquimal também apresentou formação óssea, com características teciduais organizadas, próprias do tecido ósseo maduro. Quando

associada ao pó de osso e ao PRP, as características histológicas apresentaram-se com tecido organizado, regular, maduro com células bem formadas e organizadas.

O uso de materiais com fatores de crescimento celular ósseo melhoram a qualidade e organização do tecido neoformado. Quanto maior o número de fatores de enriquecimento usados, melhores foram os resultados quanto a qualidade tecidual neoformada.

Palavras-chave: osso, malformação crânio-facial, calvária, retalho, reconstrução, face, enxerto ósseo, enxerto de gordura, plasma rico em plaquetas, célula-tronco mesenquimal, ácido hialurônico, coelho, embriogênese óssea.

## Summary:

Craniofacial deformities caused by traumas, tumor resections or congenital malformation are frequent in medical practice, and their treatment with reconstructive surgeries are common, especially in plastic surgery, which aim to provide the patients with better quality of life and functional improvement of speech, breathing, chewing and swallowing.

Many different techniques are described to correct bone defects. They have advantages and disadvantages, chosen according to the type of deformity.

This study evaluated a vascularized galeal and periosteum flap filled with bone fragments, platelet rich plasma, mesenchymal stem cells and hyaluronic acid, using rabbits, which could possibly substitute the bone graft in reconstructive surgery, especially for facial defects.

It was an experimental study, with 98 rabbits divided into twelve groups, submitted to a surgical procedure to construct a calvaria flap. A tubular flap with the periosteum inside was constructed and filled with bone fragments, platelet rich plasma (PRP), mesenchymal stem cells (MSC) and hyaluronic acid. Group 1 was not manipulated. In Group 2, the tubular flap was maintained empty. Group 3 had the flap filled with bone fragments, in Grupo 4 the flap was maintained empty. Group 5 had the flap filled with PRP. In Group 6 the flap was filled with PRP and bone fragments. The Group 7 was filled with MSC. Group 8 had the flap filled with MSC and bone fragments. The Group 9 had the flap filled with MSC and PRP. In Group 10, the tubular flap was filled with PRP, MSC and bone fragments. The Group 11 was maintained empty and Group 12 was filled with hyaluronic acid.

The results were evaluated using image methods and histological analysis.

The results demonstrated that, in the experimental model used, the groups with only periosteum, this is the empty tubular flap, presented small and irregular bone formation. In the group with PRP, it also had irregular and immature bone formation. When the PRP was associated to bone fragments it had a more regular and organized formation.

The group with mesenchymal stem cell also presented bone formation, with organized tissue characteristics, proper of mature osseous tissue. When associated to bone fragments and PRP, the histological characteristics presented organized, regular, mature tissue with organized and well formed cells.

The use of materials with osseous cellular growth factors improves the quality and organization of the neoformed tissue. The more enrichment factor used, the better the neoformed tissue quality result was.

Keywords: bone, calvaria, craniofacial malformation, calvaria, flap, reconstruction, face, graft, mesenchymal stem cell, platelet rich plasma, hyaluronic acid, rabbit, osseous embryogenesis.



# Introdução

## 1. Introdução:

As deformidades craniofaciais, tanto congênitas como adquiridas, necessitam de cirurgia reparadora, com técnicas especializadas e profissionais qualificados para corrigir os defeitos provocados usualmente por tumores, traumas ou deformidades congênitas. A intenção do tratamento é corrigir a parte funcional da fala, respiração, mastigação e deglutição, além de melhorar os defeitos físicos e proporcionar melhor qualidade de vida para os pacientes<sup>1,2</sup>.

As ressecções de tumores de crânio e face são usualmente extensas e agressivas pois, mesmo quando pequenas áreas são afetadas, estas incluem muitas estruturas vasculares, nervosas, musculares e ósseas. Além do tratamento cirúrgico primário, muitas vezes estes são complementados por tratamentos adjuvantes como a radioterapia, que agem nas células tumorais mas alteram também os tecidos adjacentes, causam processos inflamatórios, tornando-os fibróticos ou cicatriciais, com menos elasticidade e menor vascularização, dificultando as reconstruções futuras<sup>3-5</sup>.

Os traumas de face têm importância pela grande prevalência. Acidentes automobilísticos e a violência são facilitadores freqüentes dos traumas e têm alta porcentagem de óbitos e seqüelas.

Outra causa de deformidade facial que necessita de tratamento reparador é a malformação congênita. Deformidades presentes ao nascimento que levam a problemas psicológicos pela diversidade de aparência física<sup>1, 6-13</sup>.

As formas de tratamento das deformidades faciais dependem do tamanho e local do defeito, disponibilidade da área doadora e condições clínicas dos pacientes.

As opções de tratamento atuais incluem os enxertos ósseos, retalhos locais, retalhos compostos, retalhos microcirúrgicos, materiais aloplásticos, substitutos ósseos e engenharia tecidual.

O enxerto ósseo é um fragmento do tecido, sem vascularização, que é transferido de um local para outro do organismo. Utilizado para promover sustentação, volume e principalmente reposição de perda tecidual óssea. Possui propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas. Além das células ósseas maduras, possuem também a presença de células-tronco mesenquimais adultas na medula óssea.

As áreas doadoras autólogas podem ser a calota craniana, costela e crista ilíaca. Tem boa integração óssea sem risco de rejeição, por ser tecido ósseo autólogo, mas apresentam grau de absorção variável o que compromete o resultado a longo prazo<sup>5,14</sup>.

Os retalhos locais são porções de tecidos ao redor do defeito, vascularizados, utilizados em reconstruções menores. Podem ser retalhos dérmicos ou dermogordurosos de avanço ou rotação. Pacientes submetidos a radioterapia para tratamento de tumores apresentam comprometimento da perfusão tecidual local o que invariavelmente dificulta a utilização destes retalhos.

Nas reconstruções craniofaciais, os retalhos compostos, constituídos por dois ou mais tipos de tecidos diferentes também são utilizados. O retalho de fáscia temporoparietal, descrito por Golovine em 1898, é comumente utilizado por apresentar vantagens como uma fina e resistente cobertura para um tecido ósseo ou cartilaginoso e com um suprimento sangüíneo necessário para a viabilidade deste tecido. Podem ser usados em reconstruções de maxila, assoalho de órbita e zigoma. Apresentam pedículo vascular próprio e podem ser associados a um fragmento ósseo para proporcionar maior sustentação e volume da área a ser reconstruída<sup>15,16</sup>.

Retalho livre é a transferência de tecido vascularizado de um local para outro do organismo. Este é indicado em reconstruções de grande extensão, com área tecidual local com pouca viabilidade e vascularização. Contêm suprimento sanguíneo próprio através de anastomose de vasos do retalho a um pedículo vascular doador<sup>4,17</sup>.

No entanto, necessitam de treinamento técnico específico em microcirurgia, materiais especiais, fios específicos e microscópio em centro cirúrgico, o que dificulta sua utilização em hospitais onde não há esta estrutura física e profissional<sup>4,17</sup>.

As complicações, como a trombose arterial ou venosa, levam à perda total do retalho e apresentam grande morbidade da área doadora<sup>4,17</sup>.

Os materiais aloplásticos como: placas e parafusos de titânio, implantes de polimetilmetacrilato, polietileno poroso, hidroxiapatita e silicone são considerados uma opção nas cirurgias reparadoras pela facilidade de manipulação e custo moderado, mas apresentam desvantagens como maior risco de infecção, extrusão e absorção das estruturas ósseas subjacentes por ser material indeformável, além de ser contraindicado em deformidades craniofaciais infantis, podendo dificultar o crescimento ósseo craniofacial<sup>17-19</sup>.

Substitutos ósseos também são opções de uso na cirurgia reparadora. Podem ser de origem humana, cerâmica (hidroxiapatita, tricálcio-fosfato), vidro bioativo, sulfato de cálcio ou polímeros. A hidroxiapatita, formada por fosfato de cálcio cristalino, é considerada um dos materiais mais comumente utilizados<sup>20, 21,22</sup>. São capazes de fazer a reparação óssea, mas não mantém a espessura óssea necessária para um bom resultado<sup>21</sup>.

A engenharia tecidual tornou-se nova opção de técnica reparadora. A presença de células adultas mesenquimais em tecidos como a medula óssea e o tecido adiposo, demonstrou a capacidade de diferenciação em linhagens celulares como osteoblastos, condroblastos, adipócitos, fibroblastos, mioblastos e células nervosas<sup>23-25</sup>.

As células-tronco mesenquimais foram diferenciadas experimentalmente em todas as linhagens de tecidos conectivos e mesenquimais por Caplan em 1991 e Pittenger e col. em 1999, e têm capacidade de neoformação ou regeneração de estruturas cranifaciais. As células adultas mesenquimais são derivadas de diversos tecidos como a medula óssea, tecido celular subcutâneo, músculo, polpa dentária, sinóvia e cordão umbilical, que são potenciais doadores para a terapia celular<sup>26-29</sup>.

A obtenção destas células da medula óssea é realizada por punção da crista ilíaca. Em animais experimentais, esta punção pode ser de crista ilíaca ou tíbia<sup>23,30</sup>. Quando retirada do tecido adiposo, pode ser coletada em bloco de tecido subcutâneo ou lipoaspiração. Em animais, são retiradas bolsas de gordura do dorso ou região abdominal<sup>23</sup>.

Após a coleta, o material é encaminhado ao laboratório onde sofrerá o preparo adequado até a formação, análise e quantificação do tipo celular desejado<sup>25,31</sup>. Para discriminar as células-tronco mesenquimais de fibroblastos e outras células, a literatura sugere que estas células devem ser aderentes ao plástico, apresentem a expressão de marcadores de superfície e diferenciem-se em, no mínimo, três linhagens celulares diferentes<sup>32</sup>.

Os marcadores de superfície que se expressam nas células-tronco mesenquimais são: CD73, CD90, CD29, CD44, CD49e, CD105 e CD106. Com ausência dos marcadores: CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD78, CD45, CD10<sup>33, 34, 35</sup>.

A célula-tronco derivada do tecido adiposo, descrita por Zuk e col. (2001), tem propriedade multipotencial, capaz de diferenciar-se em osteoblastos e condroblastos

e tem sido muito explorada para utilização nas terapias regenerativas de osso e cartilagem. São fáceis de coletar tanto através de ressecções cirúrgicas do subcutâneo como através de lipoaspiração com pequenas incisões<sup>36-38</sup>.

Apesar dos resultados promissores, o uso de células-tronco e engenharia tecidual necessitam de centros especializados capazes de coletá-las e prepará-las em meios ideais capazes de proporcionar a neoformação celular, o que dificulta a sua utilização.

Outros fatores também são descritos pela importância na formação óssea como o periósteo, que atua no processo de cicatrização óssea e apresenta intensa reação inflamatória 24 a 48 horas após o trauma local<sup>39-42</sup>. As células derivadas do periósteo induzem, além da condrogênese e osteogênese, também a angiogênese, com a formação de tecido vascular importante para a evolução e neoformação celular<sup>40</sup>.

Além disso, nos traumas ósseos, o processo inflamatório desencadeado para a regeneração óssea, libera diversos sinalizadores moleculares e proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e migração celular como: proteína óssea morfogenética (BMP), Hedgehog, proteína osteogênica-1 (OP-1), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e Wnt<sup>40</sup>.

Proteínas como a BMP (bone morphogenetic protein) tem grande importância na formação óssea com papel fundamental no crescimento e diferenciação de osteoblastos e a OP-1 promove maturação e diferenciação de células da medula óssea em osteoblastos. Sampath e col. (1992) e Yeh e col. (2004), demonstraram que a OP-1 adicionada à culturas de células ósseas enriquecidas com osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação, estimulam a proliferação celular, a formação de colágeno e a síntese e osteocalcina, uma proteína não-colagenosa encontrada no osso, secretada por osteoblastos e que tem um papel na mineralização e homeostase de íons de cálcio no organismo<sup>43-46</sup>.

Outro fator utilizado para estimular a formação óssea é o plasma rico em plaquetas (PRP). Este é uma amostra de plasma com alta concentração de plaquetas, normalmente maior que  $1,1 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ L. Considerada uma fonte natural de fatores de crescimento que influenciam a regeneração óssea<sup>47</sup>.

A técnica de separação e concentração de plaquetas começou a ser aplicada em cirurgias odontológicas, sendo hoje aplicada também em outras áreas como a

ortopedia e traumatologia, cirurgia plástica, no tratamento de feridas, úlceras de diabéticos e cirurgias cardiovasculares<sup>47</sup>.

Produzido a partir de sangue venoso coletado e centrifugado, o plasma é separado em frações. Separa-se o PRP que forma um gel de colágeno quando associado com trombina autóloga e gliconato de cálcio 10% <sup>47</sup>.

Estudos in vitro mostraram que o plasma rico em plaquetas aumenta a produção de colágeno e leva à diferenciação de células tronco em condrócitos. Apresenta fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF), um peptídeo ativo na regulação da replicação, movimento e sobrevivência celular; fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), mediador biológico importante na regeneração dos tecidos com proliferação celular, quimiotaxia e síntese de matriz extracelular; fator de transmissão do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), que controla a proliferação e diferenciação celular; fator de crescimento endotelial (VEGF), uma glicoproteína dimérica capaz de promover o crescimento de células endoteliais vasculares; fator de crescimento de fibroblasto que estimula a proliferação de fibroblastos e a formação de colágeno; fator de crescimento semelhante à insulina, proteína que atua no crescimento, desenvolvimento da musculatura, reduz os níveis de glicose no sangue, reduz os níveis de gordura corporal, altera a oxidação lipídica e aumenta a síntese de proteínas; e fator de crescimento queratinócito, que tem natureza adesiva e promove hemostasia <sup>14,47-51</sup>.

Avaliamos as técnicas de reconstrução já utilizadas, as vantagens e desvantagens de cada uma, além das descrições de fatores de crescimento e formação celular.

O processo de formação que ocorre nos ossos crânio-faciais é intramembranosa. A embriogênese óssea intramembranosa, inicia-se a partir de células mesenquimais indiferenciadas que agrupam-se e, através de fatores genéticos e fatores extrínsecos, começam a formar uma matriz com vasos sanguíneos, fibroblastos e osteoblastos. Formam espículas de matriz óssea que se mineralizam e formam as trabéculas ósseas, considerado osso imaturo ou pré-osso. Fosfato de cálcio é depositado e então ocorre a organização celular. Após o aparecimento de osteoclastos, o tecido imaturo é absorvido e substituído por tecido

ósseo maduro ou lamelar com camadas bem ordenadas em disposição paralela ou concêntrica<sup>52,53</sup>.

Os osteoblastos são células mesenquimatosas indiferenciadas e pluripotentes localizadas preferencialmente no periósteo e na medula óssea, responsáveis pela formação óssea<sup>52</sup>.

No início, o osso não tem um padrão organizado e progressivamente torna-se organizado e reúne-se em lamelas ou camadas. Ao redor dos vasos sanguíneos, formam-se lamelas concêntricas ou sistemas de Havers. Alguns osteoblastos permanecem na periferia do osso em desenvolvimento e continuam a depositar camadas. O osso entre as placas superficiais contém os osteoclastos, células responsáveis pela absorção óssea<sup>53</sup>.

Os pré-osteoblastos são células que encontram-se nas superfícies de formação óssea e tem reduzida capacidade de proliferação, mas gradativamente adquirem as características de osteoblastos. Estes, então, tornam-se maduros quando apresentam-se como células cúbicas, polarizadas<sup>52</sup>.

Os osteócitos ficam organizados e regularmente espaçados na matriz óssea<sup>58</sup>.

Imaginamos um retalho de periósteo e gálea, vascularizado através dos vasos temporais, preenchido com pó de osso, plasma rico em plaquetas e/ou células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo.

Este retalho poderia ser transposto e utilizado nas reconstruções de mandíbula, zigoma, malar ou órbita. Com menos complicações como rejeições por ser autólogo. Eventualmente poderia ser transferido como um retalho livre tendo os vasos temporais anastomosados em um vaso receptor. Além disso, poderia ser moldado de acordo com a forma do defeito, pois o periósteo e a gálea são estruturas de fácil manipulação.

Foram escolhidos o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e as células-tronco mesenquimais adultas provenientes da gordura autóloga como estimuladores do processo de formação óssea dentro do retalho de gálea e periósteo.

As células-tronco mesenquimais são capazes de diferenciarem-se em diversos tipos celulares, dependendo dos fatores reguladores presentes no meio, sendo que em áreas vascularizadas, as células com potencial osteogênico formarão

naturalmente osteoblastos<sup>52</sup>.

Estas células estão também envolvidas na cicatrização de feridas, estimulam a angiogênese, reduzem a inflamação local e têm atividade antimicrobiana pois secretam proteínas antimicrobianas e fatores imuno moduladores<sup>54-56</sup>.



**Objetivo**

## **2. Objetivos:**

Objetivo primário:

Avaliar a formação óssea em retalhos tubulares vascularizados, gáleo-periostais, enriquecidos com o uso de pó de osso, plasma rico em plaquetas, células-tronco mesenquimais e ácido hialurônico.

Objetivo secundário:

Avaliar a eficácia da diferenciação óssea através do estímulo de crescimento do pó de osso, plasma rico em plaquetas e das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.



## Métodos

### 3. Métodos:

Foi realizado estudo experimental no Laboratório da UNIPEX – Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista – UNESP sob o Protocolo CEUA 963/2012.

Foram utilizados 98 coelhos da linhagem Norfolk, machos, com peso médio de 2616,84 (+/- 400,27) gramas, que corresponde a aproximadamente 70 dias de vida, que equivale a um coelho jovem. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - "Campus" de Botucatu, um biotério convencional, que não possui condições de atestar a sanidade dos animais. O número da amostra foi determinado por um estudo prévio da mesma linha de pesquisa publicado em 2013 e calculado para que seja o menor número capaz de determinar resultados significantes<sup>57</sup>.

Os animais foram distribuídos em seis lotes e foram realizados procedimentos diferentes no lado direito e esquerdo da calota craniana determinando 12 grupos.

Todos foram submetidos a procedimento cirúrgico após anestesia com Ketamina 10% - 10mg/kg (Dopalen®) e Xilazina 2% - 3mg/kg (Anasedan®) via endovenosa<sup>58</sup>.

Foi realizada a tricotomia da região cefálica superior com aparelho Oster®, posicionamento ventral, seguida de marcação da incisão mediana de 6 cm. Assepsia e antissepsia com clorexidine alcólico. Na região da incisão, a anestesia foi complementada com 1 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Figura 1).

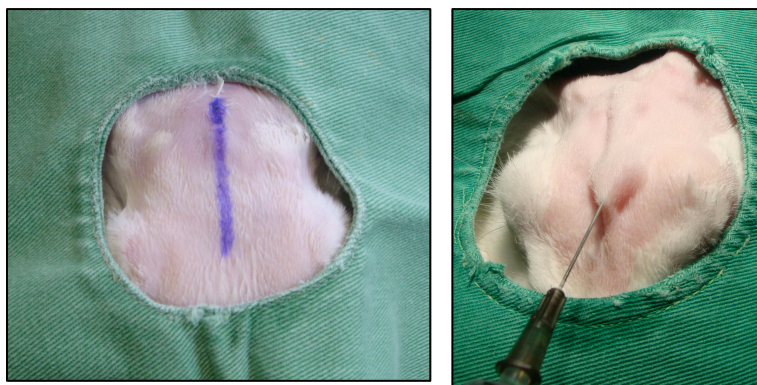


Figura 1: Preparo e marcação da incisão em região cefálica superior após tricotomia e infiltração local com lidocaína para diminuir o estímulo doloroso do procedimento ao animal.

Após a anestesia, foi realizada incisão cefálica mediana e levantados dois retalhos cutâneos laterais e dissecção até exposição da gálea. A partir deste momento foram realizadas técnicas distintas no lado direito e esquerdo da calota craniana do coelho, subdividindo-se em 12 grupos (Tabela 1).

### 3.1. Distribuição dos Grupos:

Os Grupos utilizaram os lados direito e esquerdo da calota craniana dos coelhos, sendo que os pares de grupos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 9 e 10, 11 e 12, fizeram parte dos mesmos animais, com o intuito de utilizar o menor número de coelhos.

O Grupo 1 foi composto por 10 animais. A gálea e o perióstio não foram manipulados.

O Grupo 2, assim como o Grupo 1, foi composto pelos mesmos 10 animais, foi realizada exposição da gálea, levantado retalho gáleo-periostal da metade esquerda da calota craniana através de descolamento, medindo 15 mm x 30 mm, com identificação dos vasos temporais, e realizado retalho tubular formando um cilindro com o perióstio voltado para dentro (Figura 2).

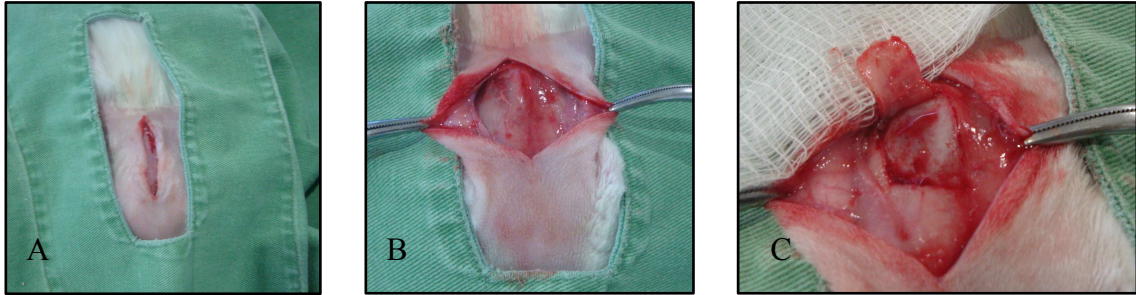


Figura 2: A - Incisão cefálica mediana, B - dissecação de retalhos cutâneos laterais até exposição da gálea, C - retalho gáleo-periosteal de metade da calota craniana elevado por descolamento.

Os cilindros foram fechados com uma sutura contínua com fio multifilamentar, absorvível, de ácido poliglicólico (vicryl® - Ethicon/ Johnson & Johnson) 5.0, com agulha cilíndrica, e os mesmos foram fixados no periósteo mantido na porção mais anterior da calota craniana para não ocorrer a mobilização do retalho.

A pele foi suturada com ponto contínuo com fio monofilamentar de mononylon 4.0 (Ethicon/ Johnson & Johnson).

No Grupo 3, composto por 15 animais, o mesmo procedimento para confecção do retalho tubular foi realizado do lado direito, mas este foi preenchido com pó de osso retirado da cortical da calota craniana através de raspagem com lâmina nº 23. O pó de osso foi pesado em balança de alta precisão para manter uma média de peso semelhante entre os grupos, para que a quantidade de tecido ósseo não interferisse no resultado (Figuras 3-5). O pó de osso foi introduzido no retalho com pinça de Adisson sem dente. A sutura e fixação do retalho e a sutura da pele seguiram o mesmo padrão descrito anteriormente.

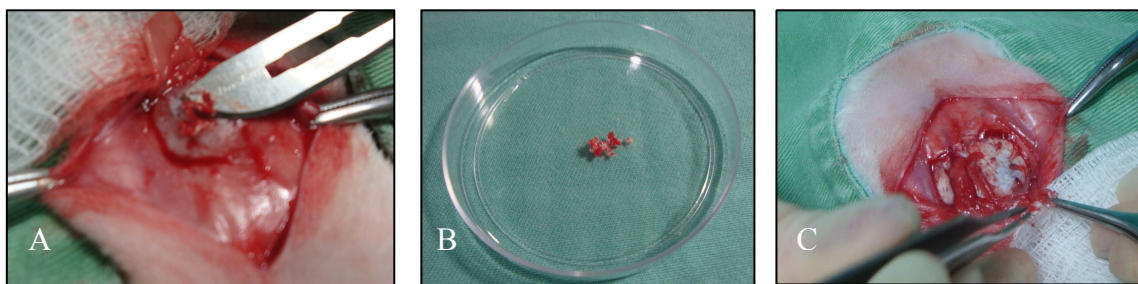


Figura 3: A – Raspagem da calota craniana com lâmina de bisturi nº 23 para retirar o pó de osso, após levantamento de retalho gáleo-periosteal. B – Fragmentos de osso da calota craniana pesado e utilizado no preenchimento do retalho tubular do Grupo 3. C – Após término do preenchimento de retalho unilateral o outro lado do tecido gáleo-periosteal também foi elevado para a confecção do retalho tubular contralateral vazio pertencente ao Grupo 4.



Figura 4: O pó de osso foi pesado em balança de alta precisão.

No Grupo 4, composto pelos mesmos 15 animais do Grupo 3, o mesmo procedimento para confecção e fixação do retalho tubular foi realizado do lado esquerdo. Este foi mantido vazio, sendo que o lado contralateral foi manipulado e com utilização de pó de osso (Figura 5). A sutura da pele manteve-se do mesmo padrão já descrito.

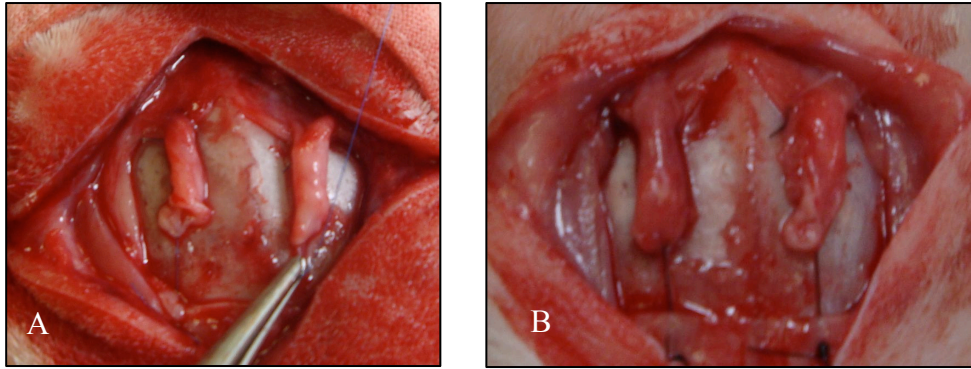


Figura 5: A - Após a confecção do retalho tubular e sutura, a extremidade do retalho é fixada na gálea da região anterior da calota craniana. B - Imagem final após o término da confecção dos retalhos bilaterais fixados no periósteo anterior. À direita, pertencente ao Grupo 3 e à esquerda, pertencente ao Grupo 4.

O Grupo 5, composto por 15 animais, teve o mesmo procedimento para confecção e fixação do retalho tubular descrito do lado direito da calota craniana, mas este foi preenchido com plasma rico em plaquetas (PRP). A pérola de PRP foi introduzida no retalho com o auxílio de uma pinça de Adisson sem dente (Figura 6). A pele foi suturada com ponto contínuo com fio monofilamentar de mononylon 4.0 (Ethicon/ Johnson & Johnson).

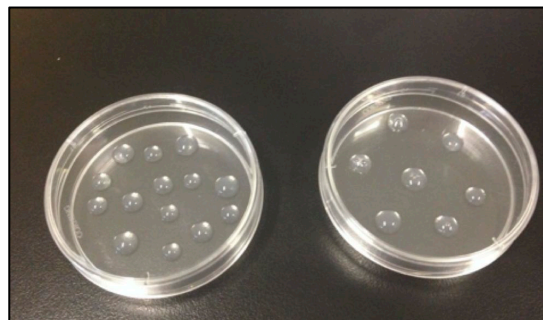


Figura 6: Pérolas de PRP preparadas e separadas para transporte até o laboratório onde é realizado o procedimento cirúrgico. O transporte deste material é feito em isopor com gelo para manter a temperatura aproximada a 4°C.

No Grupo 6, composto pelos mesmos 15 animais do Grupo 5, foi realizado o mesmo retalho tubular à esquerda e foi preenchido com plasma rico em plaquetas e pó de osso. Primeiro foi introduzido o pó de osso com pinça de Adisson sem dente e,

em seguida, foi introduzida a pérola de PRP. A pele foi suturada conforme descrito anteriormente.

O Grupo 7, composto por 15 animais, teve o mesmo procedimento para confecção e fixação do retalho tubular já descrito à direita e foi preenchido com células-tronco mesenquimais e ácido hialurônico, que foram preparados em laboratório, em pérolas, e introduzidos no retalho com pinça Adisson sem dente.

No Grupo 8, com os mesmos 15 animais, foi realizado o retalho tubular à esquerda, preenchido com células-tronco mesenquimais, ácido hialurônico e pó de osso. Primeiro foi introduzido o pó de osso, seguido da pérola de células-tronco mesenquimais e ácido hialurônico. A pele foi suturada conforme já descrito.

O Grupo 9, composto por 15 animais, teve o retalho tubular preenchido com células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, em pérolas, com o uso de pinça de Adisson sem dente (Figura 7). O procedimento foi realizado do lado direito da calota craniana. A pele foi suturada com ponto contínuo com fio de mononylon 4.0.



Figura 7: Pérola de PRP associado com célula-tronco mesenquimal autógena, preparada e identificada para cada coelho. Visão lateral da pérola preparada em laboratório.

O Grupo 10, com os mesmos 15 animais do Grupo 9, teve o retalho tubular realizado à esquerda e preenchido com células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas e pó de osso. O pó de osso foi introduzido primeiro com pinça Adisson sem dente e, em seguida, foi introduzida a pérola de CTM e PRP (Figura 8). A pele foi suturada conforme já descrito anteriormente.

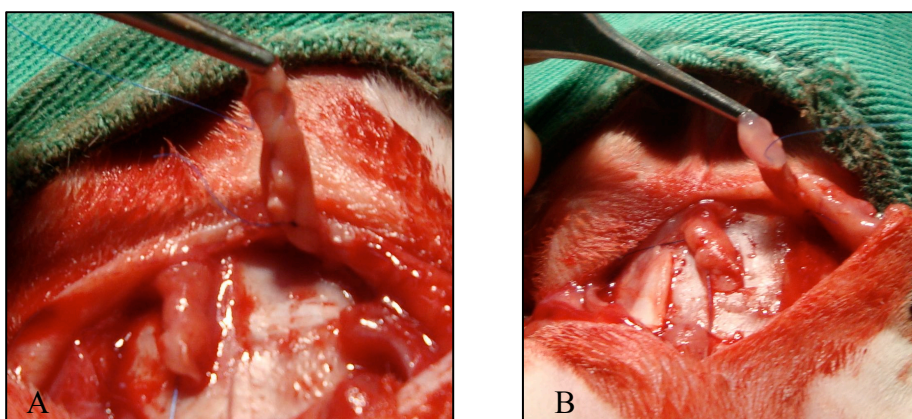


Figura 8: A - Após a confecção do retalho tubular à direita pertencente ao Grupo 9, sutura do retalho tubular à esquerda pertencente ao Grupo 10. B - Introdução da pérola de PRP com células-tronco mesenquimais após inclusão do pó de osso no retalho do Grupo 10.

No Grupo 11, os 15 animais foram operados e confeccionados os retalhos tubulares descritos e mantidos vazios à direita, sendo que houve manipulação cirúrgica do lado contralateral com a utilização de ácido hialurônico.

O Grupo 12, com os mesmos 15 animais, teve o retalho tubular realizado à esquerda da calota craniana e preenchido por injeção com seringa de 1 ml e agulha 13 x 4,5 mm, com 0,1 ml de ácido hialurônico Derma Hyal® 14 mg/ml aprovado pelo Ministério da Saúde<sup>59</sup>. A pele foi suturada conforme já descrito anteriormente.

Tabela 1: Disposição e divisão dos grupos (n = número da amostra).

Lote (n)	Grupo	Técnica utilizada
1 (10)	1	Não manipulado
1 (10)	2	Retalho tubular vazio sem manipulação contralateral
2 (15)	3	Retalho tubular com pó de osso
2 (15)	4	Retalho tubular vazio com manipulação contralateral - uso de pó de osso
3 (15)	5	Retalho tubular com plasma rico em plaquetas
3 (15)	6	Retalho tubular com plasma rico em plaquetas e pó de osso
4 (15)	7	Retalho tubular com células-tronco mesenquimais
4 (15)	8	Retalho tubular com células-tronco mesenquimais e pó de osso
5 (15)	9	Retalho tubular com plasma rico em plaquetas e células-tronco mesenquimais
5 (15)	10	Retalho tubular com plasma rico em plaquetas, células-tronco mesenquimais e pó de osso
6 (15)	11	Retalho tubular vazio com manipulação contralateral - uso de ácido hialurônico
6 (15)	12	Retalho tubular com ácido hialurônico

### 3.2. Preparo das células-tronco mesenquimais:

As células-tronco mesenquimais adultas autólogas do tecido adiposo foram formuladas a partir de um fragmento de gordura do dorso, região posterior, coletado dos animais pré classificados em grupos, previamente anestesiados conforme já citado (Figura 9). Estes animais foram escolhidos de forma randomizada aos 30 dias de vida e distribuídos entre os Grupos 7, 8, 9 ou 10, quando foram submetidos a coleta da gordura para que, após aproximadamente 40 dias, com a produção de células-tronco mesenquimais foram, então, submetidos ao procedimento cirúrgico para a confecção do retalho gáleo-periosteal.

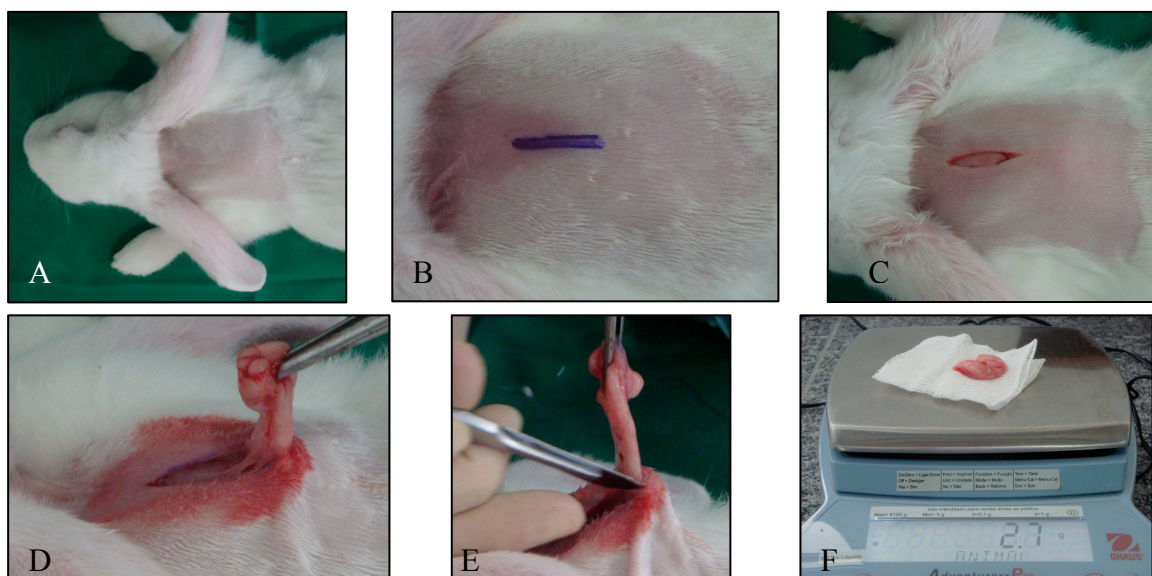


Figura 9: Seqüência do procedimento para retirada de tecido adiposo dorsal. A – Coelho na posição ventral com a região dorsal tricotomizada. B – Marcação da incisão a ser realizada. C – Incisão de aproximadamente 2 cm em região dorsal do coelho. D – Identificação e dissecção do tecido adiposo dorsal. E – Retirada de tecido adiposo e F – pesagem do tecido total retirado do animal.

O material adiposo foi pesado e encaminhado para o laboratório em tubo Falcon em meio de cultura adequado com antibiótico (ciprofloxacina) e antifúngico (fluconazol) em concentração de 100  $\mu$ l/ml de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) cada, com volume total de 10 ml por tubo onde permaneceram por 24 horas armazenados em geladeira à +/- 4°C. Posteriormente foram cultivadas as células-tronco mesenquimais utilizadas nos Grupos 7, 8, 9 e 10. As células utilizadas foram autólogas (Figura 10).

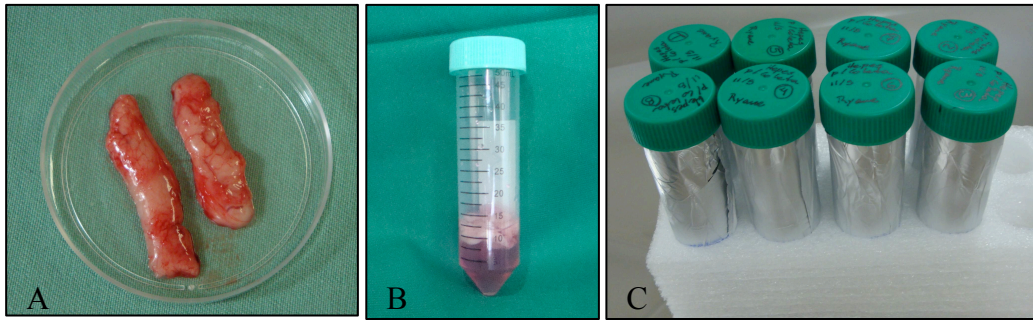


Figura 10: A – Tecido adiposo ressecado do dorso do coelho. B – Material ressecado e inserido em tubo Falcon em meio de cultura com antibiótico. C – Tubos identificados e protegidos para envio ao laboratório.

Após 24h em geladeira, foi realizada a micro-fragmentação do bloco de tecido adiposo em condições estéreis (capela de fluxo laminar Classe IIA) (Figura 11) . Para cada amostra, foi separada uma placa de Petri 12 x 95 mm estéril e descartável. Foram retirados os fragmentos de tecido adiposo dos tubos cônicos e, utilizando pinça Kelly estéril, esses fragmentos foram lavados um a um com pelo menos 50 ml de solução fisiológica 0,9%, estéril, acima de um Becker e em seguida foram isolados na placa de Petri correspondente a cada amostra.



Figura 11: Câmara de fluxo laminar vertical utilizado para a manipulação celular evitando a contaminação.

Com bisturi e tesoura estéreis, a gordura foi repartida em micro-fragmentos de 1 mm<sup>2</sup> para facilitar a ação enzimática promovendo maior recuperação de célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo (CTM-TA).

O conteúdo fragmentado foi transferido para tubo cônico de 15 ml junto com o volume de HEPES e quantidade de colagenase tipo I necessários, na proporção: 1 g de tecido adiposo (TA) – 2 ml de HEPES – 4 mg de colagenase tipo I.

Os tubos com TA e enzima foram incubados em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> *overnight* (duração de 15h).

Foram realizadas as lavagens dos fragmentos que sofreram ação da colagenase tipo I. Para isso, adicionou-se o equivalente do volume da amostra de HEPES com 10% de soro fetal bovino (SFB) para quebra da ação enzimática. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos (950 gravidade).

O sobrenadante foi descartado e 4 ml de HEPES por tubo foram adicionados com ressuspensão do pellet e seguida de nova centrifugação (1200 rpm por 10 minutos – 950 gravidade). Esta etapa foi repetida mais duas vezes (Figura 12).

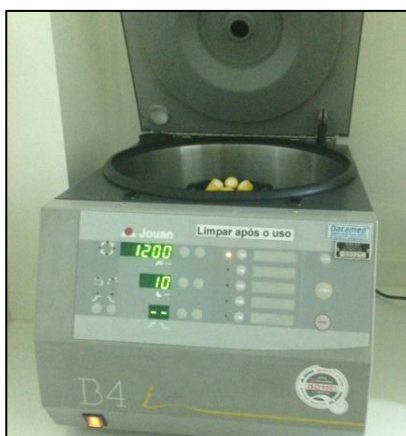


Figura 12: Centrifugação dos tubos por 10 minutos a 1200 rpm (950 g).

Ao final das lavagens, procedeu-se nova contagem celular e análise de viabilidade.

Alíquotas destas amostras foram congeladas para processamento pré-plaqueamento por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos anti-CD45, anti-CD11b, CD90 e CD44.

As amostras foram, então, plaqueadas com 5 ml de DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) a 20% de SFB em frascos de cultura para células aderentes ao plástico de 25 mm<sup>2</sup> (T25) e então foram incubadas em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

Foram realizadas mais três trocas de meio nos frascos T25, reposição com 5 ml de DMEM/F-12 a 20% SFB.

Após 15 dias foi realizada tripsinização dos frascos. Este procedimento visa o desprendimento, através da enzima tripsina, das células do frasco, já que estas são aderentes ao plástico. O protocolo de tripsinização utilizado foi:

Após visualização em microscópio, observou-se confluência  $\geq 80\%$ . Isso significa que já não há mais espaço suficiente para as células se multiplicarem. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de bomba de aspiração e pipeta Pasteur de vidro, foram adicionados 5 ml de HEPES que foi, em seguida, aspirado. Esta etapa é realizada três vezes, para que não haja resquício de SFB no frasco, pois este inativa a tripsina.

Foram adicionados 1,25 ml de tripsina - EDTA 0,25% por frasco T25. Os frascos foram levados à estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> e incubados por 5 - 10 minutos. Neste intervalo de tempo, os frascos foram observados em microscópio invertido, até que seja evidenciado total desprendimento das células. Em seguida adicionou-se o volume equivalente de HEPES e de SFB, ou seja, 1,25 ml de cada solução por frasco.

A solução resultante de cada frasco foi transferida a tubos cônicos de 15 ml e estes foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de bomba de aspiração e pipeta Pasteur de vidro.

O pellet foi ressuspenso em 1 ml de DMEM/F-12. Desta solução, retirou-se 30µL para contagem celular e avaliação de viabilidade com azul de Trypan em câmara de Neubauer.

A solução com células foi então completada com meio, replaqueada e congelada com 1 ml de SFB a 10% DMSO (dimetil sulfóxido) a - 80°C.

Todas as amostras apresentavam o mesmo padrão de número celular, ao redor de  $1,0 \times 10^6$  células, para que o número celular não influenciasse nos resultados.

Foram também caracterizadas pela capacidade de se diferenciar em três linhagens celulares: adiposas, ósseas e vasculares.

Para utilização no procedimento cirúrgico, as células foram descongeladas em banho-maria (Figura 13).



Figura 13: Aparelho de banho-maria para descongelamento celular.

Para os Grupos 9 e 10, onde foram usadas a associação das CTM e PRP, foi padronizado a suspensão de  $5\mu\text{L}$  de CTM ( $1,0 \times 10^6$ ) em  $15\mu\text{L}$  de PRP seguida da adição de  $1\mu\text{L}$  de trombina de coelho purificada e  $1\mu\text{L}$  de gliconato de cálcio a 10%. A gelificação ocorreu sistematicamente entre 12-15 segundos. As pérolas foram feitas dentro de placas de Petri, fechadas e transportadas em isopor para o laboratório onde foram realizadas as cirurgias e aplicações.

### 3.3. Preparo do plasma rico em plaquetas:

O plasma rico em plaquetas foi preparado em laboratório após a coleta de sangue de cinco animais saudáveis, também previamente anestesiados e sacrificados que foram utilizados no Projeto Piloto, através de punção cardíaca e utilizado nos Grupos 5, 6, 9 e 10.

O sangue coletado foi de 3,6 a 6,1 ml, média de 5,01 ml e total de 25,3 ml, sendo obtido um volume final total de plasma de 13,2 ml.

Os indicadores utilizados para o preparo do PRP foram hematócrito, hemoglobina, glóbulos brancos e plaquetometria (Tabela 2) (Anexo 1).

Tabela 2: Valores de hematócrito, hemoglobina, glóbulos brancos e plaquetometria encontrados no sangue dos coelhos utilizados para preparo de PRP. Valores de referência: Hematócrito (Ht): 40% - 60%, Hemoglobina (Hb): 9,5 – 13 g/dl, Glóbulos Brancos (GB): 6.000 – 17.000, Plaquetas: 200 – 500 ( $\times 10^3$ )<sup>60,61</sup>.

Coelhos	Dados do Hemograma			
	Ht (%)	Hb (g/dl)	GB	Plaquetas ( $\times 10^3$ )
C1	49	15,3	6400	247
C2	50	17	6200	231
C3	48	16,1	5800	276
C4	45	14,7	6700	198
C5	43	13,5	6325	224

O hematócrito médio foi de 47% e a taxa de hemoglobina de 15,3 g/dl. A média da contagem de glóbulos brancos foi de 6.285 e a plaquetometria média de 235.000/mm<sup>3</sup>. Estes parâmetros biológicos comprovam o bom estado de saúde dos animais doadores de sangue para o preparo do PRP.

O sangue foi centrifugado em 900 g (gravidade) por 15 min para separação do plasma e plaquetas da porção de células vermelhas, produzindo o PRP.

Foi realizado um *pool* de quantidades iguais de plasma dos cinco animais. Foram utilizados 1,8 ml de plasma de cada animal em função do volume do coelho 2, animal onde formou-se o menor volume deste. Desta forma, o *pool* de plasma continha amostras dos cinco animais doadores com volume total de 9 ml.

O volume final do *pool* de plasma foi dividido em microtubos de 100  $\mu$ l e mantidos a - 80°C até o momento do uso.

Com os 4,2 ml restantes (plasma total menos 9 ml utilizados no *pool* de plasma utilizado) foi procedido a purificação da trombina pelo método baseado em alterações de pH e centrifugações.

No momento de uso, o plasma fresco congelado foi inicialmente diluído em água milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (gelada) em um Becker e o pH foi reduzido para 5,3 com ácido acético a 2%. A redução de pH facilita a precipitação de proteínas. Em seguida a solução foi dividida em tubos cônicos de 50 mL e submetida a centrifugação a 900 g (gravidade) por 15 minutos.

Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* diluído em soro fisiológico. Novamente o pH foi alterado para 7,0 com carbonato de sódio a 2% e

adicionou-se a solução cloreto de cálcio para disparar a cascata de coagulação. A solução permaneceu por 2 horas em repouso para formar a rede de fibrina. Após o repouso adicionou-se soro fisiológico e acetona PA em volumes iguais e novamente, a mesma passou pelo processo de centrifugação (950 g/10 minutos). Este passo é necessário para eliminar outras proteínas que não são de relevância neste protocolo.

Pela segunda vez, o *pellet* foi descartado e novamente diluído em soro fisiológico e centrifugado a 950 g/10 minutos. O passo final do protocolo consiste na extração da trombina que está diluída no sobrenadante da última centrifugação, sendo assim, o sobrenadante deve ser armazenado e o *pellet* desprezado. A trombina purificada foi alíquotada e mantida a - 80°C. Foi realizado o teste de controle de qualidade com a determinação do Tempo de Trombina que foi de 9,5 segundos.

Para a padronização da gelificação e formação da pérola de PRP foi estabelecido protocolo para uso de terapia celular com plasma de coelho pelo laboratório do Hemocentro da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. Esta padronização foi necessária pois decidiu-se utilizar o volume mínimo de gliconato de cálcio a 10% (1 µL) para não interferir no processo de recalcificação e tornar um viés nos resultados finais.

Com a alíquota do pool de PRP congelado foi processada a dosagem dos fatores de crescimento presentes: fibrinogênio, fator Von Willebrand, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), RANTES, inibidor I do ativador de plasminogênio (PAI), fator de crescimento epidermal (EGF), angiopoetina 2 (Tabela 3).

Tabela 3: Dosagens dos fatores de crescimento no PRP.

Fibrinogênio mg%	FvW ng/ml	PDGF- AAng/ml	VEGF- AAng/ml	FGF-1 ng/ml	FGF-2 ng/ml	RANTES ng/ml	PAI 1ng/ml	EGF Ng/ml	Angp-2 Ng/ml
187	83,34	0,51	0,335	2,6	37,94	2871	984	25,6	310

O kit utilizado foi o luminex, com reagentes para a determinação humana, tendo em vista de que o mercado não dispõe de reagentes para coelhos. No entanto,

salienta-se que há uma elevada homologia entre fatores de coagulação humana e de coelho, e que isto pode acontecer entre as dosagens de fatores.

Foram utilizadas pérolas do PRP final com 235.000 plaquetas no procedimento cirúrgico, introduzidos no retalho confeccionado de gálea e periósteo nos Grupos 5, 6, 9 e 10.

### 3.4. Métodos de avaliação:

#### 3.4.1. Avaliação por imagem:

Os animais foram mantidos em ambiente próprio com água e ração *ad libitum*.

Após 30 e 60 dias foram submetidos a raio X para avaliar a viabilidade óssea do retalho.

As radiografias foram realizadas em três incidências: dorso-ventral (DV), lateral (L) e ântero-posterior (AP).

As imagens radiológicas foram analisadas por 2 avaliadores da área médica, que receberam orientações sobre o procedimento realizado, além de exames radiográficos normais para comparação (Figura 14). Este exame foi realizado antes dos procedimentos, considerado, então, como exame normal.



Figura 14: Radiografias de controle nas incidências: lateral, ântero-posterior e dorso-ventral.

Foram também submetidos a tomografia computadorizada de crânio aos 60 dias no Departamento de Radiologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Figura 15). As imagens foram avaliadas em cortes coronais de 1 mm, reconstrução tridimensional (3D) óssea e reconstrução tridimensional (3D) completa através do programa OsiriX v 5.8.2.



Figura 15: Tomografia computadorizada da Faculdade de Veterinária da UNESP, onde foram realizados os exames tomográficos de crânio dos coelhos estudados. Os animais foram anestesiados e posicionados sobre um suporte em posição ventral.

Após este exame, os animais foram anestesiados novamente, o retalho foi levantado para avaliação de sangramento local, da gálea e perióstio. Após este procedimento os animais foram sacrificados com Ketamina 10% - 80mg/kg (Dopalen®) e Xilazina 2% - 30mg/kg (Anasedan®) via endovenosa<sup>62</sup>.

#### 3.4.2. Avaliação histológica:

Os retalhos foram retirados íntegros e então enviados para avaliação histológica. Foram fixados em formol tamponado 10%, com volume 10 vezes o volume da peça, não mais que 48-72 h, depois descalcificados com EDTA ácido, totalmente incluídos em blocos de parafina, seccionados em fragmentos de 5  $\mu$ m de forma longitudinal, com três cortes em cada lâmina e então corados com Hematoxilina-eosina e Tricrômio de Massom (Figuras 16-18)<sup>63</sup>.



Figura 16: Retalho tubular ressecado após anestesia do coelho. Foi mantido íntegro e enviado para análise anátomo-patológica para evitar perda do tecido ósseo no interior.

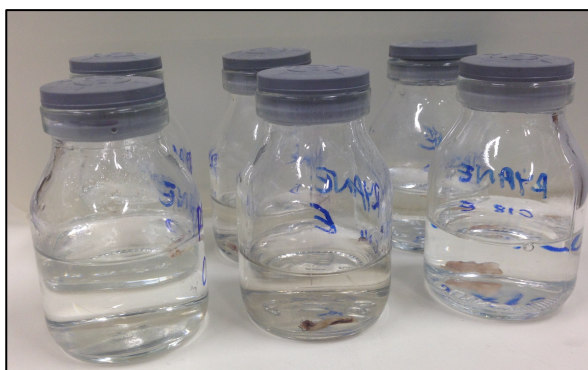


Figura 17: O material foi mantido em frascos com formol tamponado 10% e identificados.

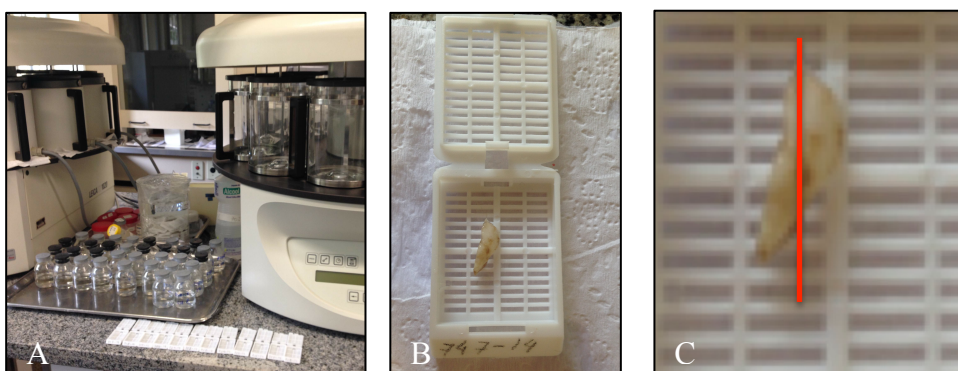


Figura 18: A - As peças em formol no laboratório, B - preparadas e identificadas em cassetes para o preparo da parafina. C – linha vermelha indicando o corte longitudinal das peças para análise histológica.

As secções foram avaliadas em microscópio *Leica DMLS*, em aumentos de 5x, 10x, 20x e 40x, com as lâminas escaneadas em equipamento 3DHitech Panoramic MIDI, com capacidade máxima de 12 lâminas escaneadas simultaneamente e registradas em programa *Sigma Scan Pro 5*.

#### 3.4.3. Critérios histológicos:

A análise histológica foi dividida em avaliação quantitativa e semi-quantitativa.

A avaliação quantitativa foi realizada através das medidas de área, perímetro e volume da estrutura óssea encontrada.

A avaliação semi-quantitativa celular foi realizada por dois avaliadores que quantificaram em uma cruz (+) a três cruces (+++) a presença de osteócitos, osteoblastos, vascularização, calcificação e organização celular.

#### 3.5. Análise estatística:

Os dados foram apresentados por meio de estatística descritiva e gráfica envolvendo distribuições de frequência e gráficos de barras ou setores. As variáveis quantitativas foram expressas em média, mediana e desvio padrão.

Realizou-se um teste de normalidade nos dados e verificou-se que alguns deles apresentaram uma distribuição simétrica e outros apresentaram uma distribuição assimétrica.

Para aqueles que apresentaram uma distribuição simétrica, ajustou-se um modelo misto com interação grupo versus tempo, seguido de Tukey-Kramer para as comparações múltiplas. Usado para comparações do peso dos animais e da gordura.

Para aqueles que apresentaram distribuição assimétrica, ajustou um modelo linear generalizado com distribuição gama.

Para verificar a correlação entre o peso do animal e o peso da gordura, foi realizada uma correlação de Pearson. Para o peso do osso foi utilizado análise de variância – ANOVA.

Foi realizado um teste de concordância entre as respostas dos avaliadores e os resultados radiográficos das incidências lateral e ântero-posterior, dentro de cada grupo e em cada tempo (30 e 60). Verificou-se também, se havia tendência entre os tempos 30 e 60 em cada grupo para a variável incidência lateral. Para finalizar,

utilizou-se o Teste Qui-Quadrado para verificar se havia associação entre a variável medida e as lâminas.

Na análise do Raio-x foi utilizado o teste Kappa. Para análise dos resultados anátomo-patológicos de área, perímetro, volume e comparação entre os avaliadores foi utilizado o teste Qui-quadrado.

A contagem celular foi analisada com GENMOD, para análise linear.

Para a viabilidade celular e a porcentagem de CD45 ajustou-se um modelo linear generalizado com distribuição gama. Nas análises de CD11b, CD44 e CD90 utilizou-se o teste de Tukey-Kramer.

Considerando-se nível de significância como  $p < 0,05$ .

O programa utilizado para realizar as análises foi o program SAS versão 9.2.



# Resultados

#### 4. Resultados:

Foram operados 98 coelhos de abril de 2014 a setembro de 2015. Destes animais, houveram quinze óbitos no total, dez ocorreram durante a anestesia para a realização de RX, quatro apresentaram infecção no membro, decorrente de ferimento em membro posterior e um com infecção do trato gastrointestinal com quadro diarréico.

Permaneceram 10 animais nos Grupos 1 e 2, 15 animais nos Grupos 3 e 4, 15 animais nos Grupos 5 e 6, 14 animais nos Grupos 7 e 8, 14 animais nos Grupos 9 e 10 e 15 animais nos Grupos 11 e 12.

O peso médio dos animais foi de 2616,84 gramas (+/- 400,27) (Tabela 4).

Tabela 4: Peso médio inicial dos coelhos nos grupos estudados. Os grupos estão divididos em pares por pertencerem ao mesmo animal.

Grupos	Peso inicial médio (g)
1 e 2	2473,27 (+/- 263,25)
3 e 4	2386,49 (+/- 209,07)
5 e 6	2325,14 (+/- 198,31)
7 e 8	3286,78 (+/- 331,83)
9 e 10	2696,21 (+/- 200,09)
11 e 12	2586,80 (+/- 290,21)

Apresentaram diferença estatística os Grupos 1/2 x 3/4 ( $p=1,0$ ), 1/2 x 5/6 ( $p=0,99$ ), 1/2 x 9/10 ( $p=0,95$ ), 1/2 x 11/12 ( $p=1,0$ ), 3/4 x 5/6 ( $p=0,58$ ), 3/4 x 11/12 ( $p=0,07$ ) e 9/10 x 11/12 ( $p=0,34$ ).

O peso do pó de osso coletado variou de 8,8 mg a 10,9 mg, média de 9,79 mg (+/- 0,67). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0,049$ ).

Na coleta de gordura do dorso do coelho para preparo e utilização das células-tronco mesenquimais, o peso médio do tecido adiposo coletado nos Grupos 7 e 8 foi de 3,23 g (+/- 1,97) e nos Grupos 9 e 10 foi de 2,76 g (+/- 0,83). Não houve diferença estatística entre eles ( $p=0,004$ ).

O peso da gordura coletada e o peso do animal foram comparados através da Correlação de Person com  $r=0,36$  e  $p=0,06$ , pouco significativo, concluindo que o peso da gordura coletada não é relacionado com o peso do animal.

A contagem final do *pool* de plaquetas foi 235.000 plaquetas.

#### 4.1. Células-Tronco Mesenquimais:

A gordura coletada foi encaminhada ao laboratório onde foi registrada quanto ao peso em gramas, volume de HEPES (ml) e Colagenase I (mg) utilizados (Anexo 2).

Após a incubação do tecido adiposo e enzima, as células foram recuperadas e procedida a contagem e a viabilidade celular.

Alíquotas destas amostras foram congeladas para processamento pré-plaqueamento por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD45, anti-CD11b, CD90 e CD44.

As amostras de células após a digestão contêm grande número de linfomononucleares circulantes que expressam CD45 (pan leucocitário) e CD11b (marcador de monócito). Os percentuais de CD90 e CD44 são mais baixos, como esperado pela amostra que ainda não sofreu a cultura.

Após a terceira passagem, a contagem celular, a viabilidade e a citometria foram novamente avaliadas (Figuras 19-24) (Tabelas 5 e 6).

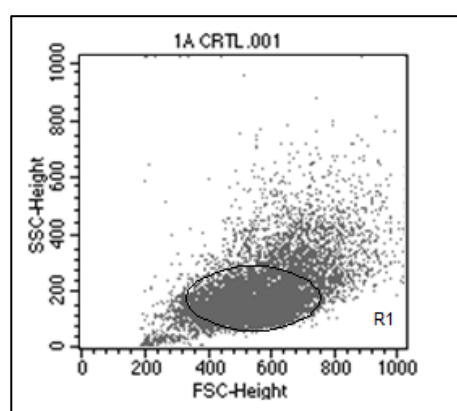


Figura 19: Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo após terceira passagem com marcadores CD45, CD11b, CD44 e CD90. A Citometria de Fluxo faz distinção das células por tamanho e complexidade, com a seleção das células linfomononucleares a serem analisadas.

Tabela 5: Contagem celular e viabilidade dos animais dos Grupos 7, 8, 9 e 10. Avaliação por citometria de fluxo após a terceira passagem.

Grupos	Número do coelho	Contagem celular ( $\times 10^5$ )	Viabilidade (%)	Citometria de fluxo (% de positividade)			
				CD45	CD11b	CD90	CD44
7 e 8	6	13,3	89	0,63	0,37	99,8	99,9
7 e 8	7	10,0	94	0,05	0,12	100	99,9
7 e 8	8	0,8	93	0,12	0,23	99,4	99,1
7 e 8	58	17,4	93	0,25	0,31	95,17	99,9
7 e 8	59	86,5	96	0,97	0,74	100	100
7 e 8	60	34,4	98	0,66	0,52	99,9	98,9
7 e 8	63	14,4	98	0,97	0,97	99,9	99,9
7 e 8	65	14,7	96	0,25	0,16	95	94,5
7 e 8	66	107,0	95	0,95	1,12	95,72	95,5
7 e 8	67	69,0	91	0,99	0,75	94,87	96,78
7 e 8	69	32,5	98	1,27	0,93	95,63	95,12
7 e 8	70	30,0	88	1,25	1,16	96,78	98,65
7 e 8	95	14,4	98	0,63	0,10	100,00	99,67
7 e 8	96	26,2	98	0,64	0,62	99,15	99,05
9 e 10	1	10,8	87	3,75	1,08	95,7	99,1
9 e 10	4	15,8	86	0,69	0,42	97,8	98,5
9 e 10	5	2,1	78	0,75	0,26	99,2	99,7
9 e 10	39	28,6	97	0,97	0,22	95,12	99,6
9 e 10	41	26,8	98	2,11	0,16	99,3	95,8
9 e 10	42	2,02	97	0,9	0,95	97,37	99,9
9 e 10	43	21,2	98	0,55	0,67	98,29	99,9
9 e 10	44	20,3	98	0,25	0,38	99,9	99,9
9 e 10	45	62	98	0,83	0,23	99,9	99,9
9 e 10	46	12	99	0,79	0,25	98,75	99,5
9 e 10	89	25,2	97	0,07	0,12	99,15	100
9 e 10	90	69,6	100	0,15	0,05	98,72	99,58
9 e 10	91	15,0	98	0,21	0,06	99,0	99,0
9 e 10	92	17,3	98	0,52	0,15	99,23	99,25

Tabela 6: Comparação das médias dos valores dos resultados da citometria de fluxo dos marcadores CD45, CD11b, CD90, CD44 pré plaqueamento e após a terceira passagem.

Marcadores	CD45	CD11b	CD90	CD44
Pré plaqueamento	63,15 (+/-18,99)	62,69 (+/-13,71)	1,63 (+/-1,07)	1,56 (+/-0,92)
Após terceira passagem	0,91 (+/-0,78)	0,49 (+/-0,42)	97,88 (+/-2,00)	98,63 (+/-1,81)

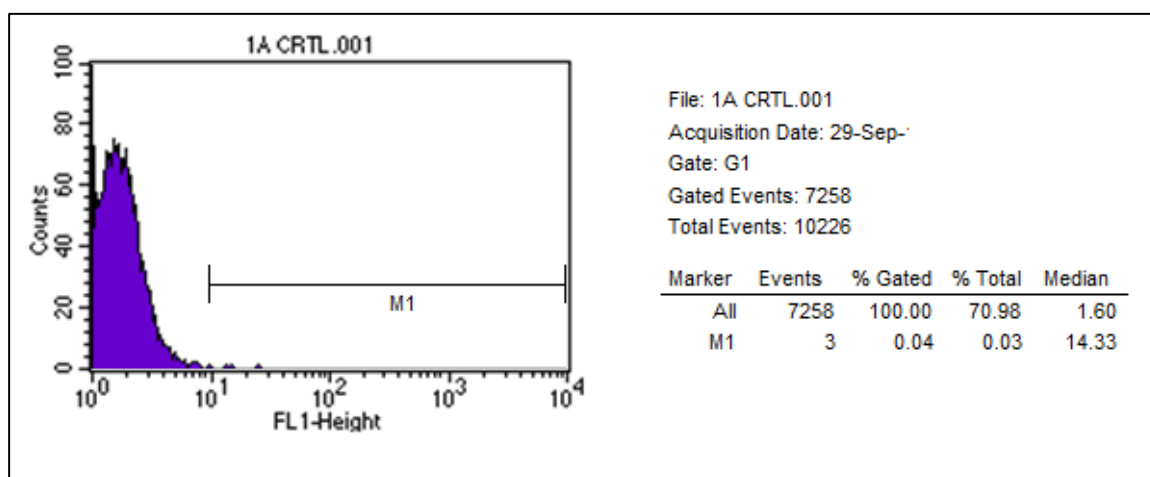


Figura 20: Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo após terceira passagem com marcadores CD45, CD11b, CD44 e CD90. Leitura do tubo controle para determinação da imunofluorescência de base.

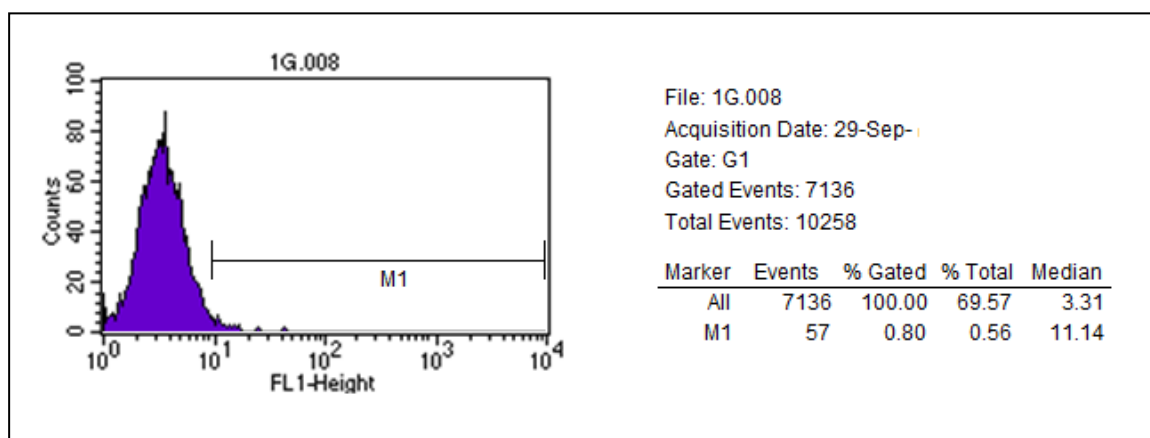


Figura 21: Resultado com CD45 com células de terceira passagem.

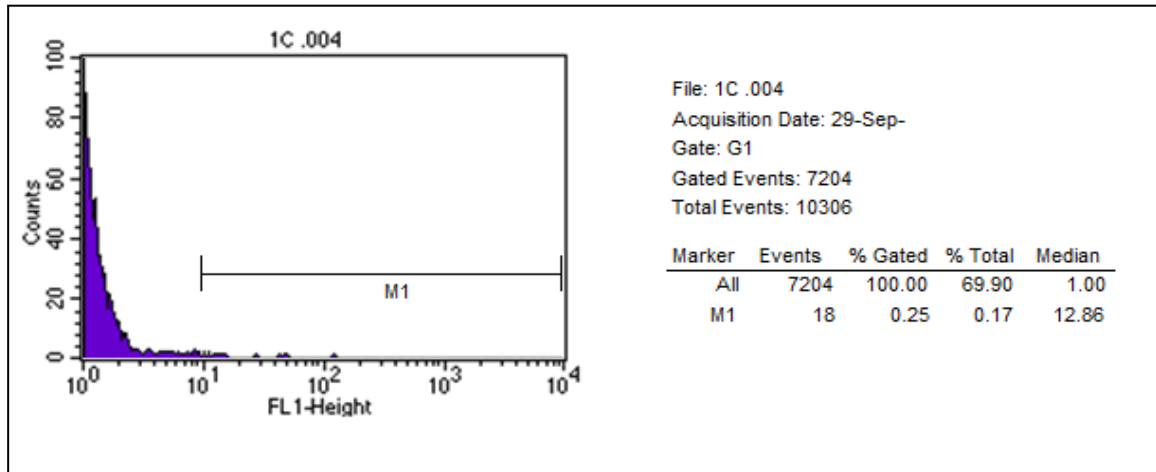


Figura 22: Resultado com CD11b com células de terceira passagem.

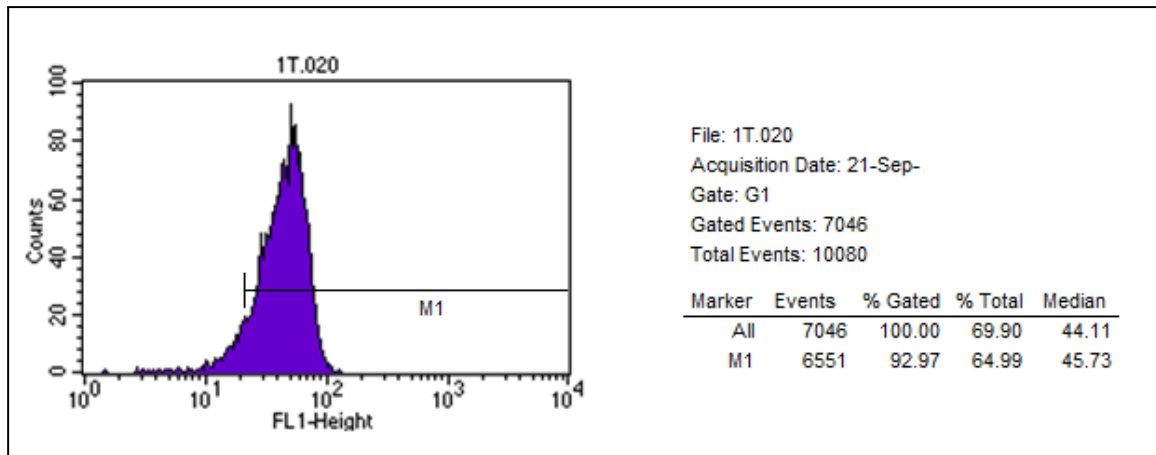


Figura 23: Resultado com CD90 com células de terceira passagem.

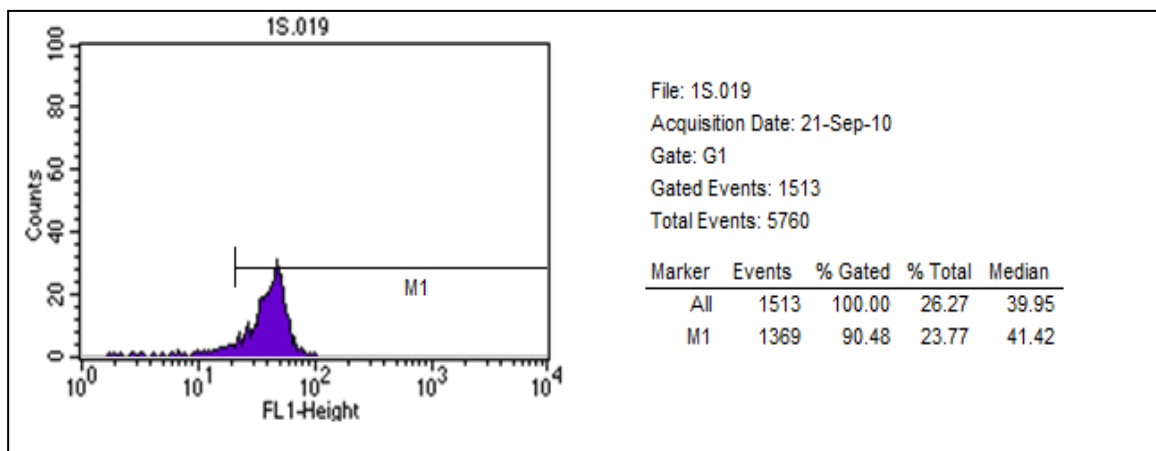


Figura 24: Resultado com CD44 com células de terceira passagem.

A contagem celular não apresentou diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), mas apresentou diferença entre o momento inicial e após a terceira passagem ( $p = 0,1553$ ). A viabilidade celular também não apresentou diferença entre os grupos, mas com diferença estatística entre os dois tempos analisados.

Os valores dos marcadores CD45, CD11b, CD44 e CD90 também não apresentaram diferença estatística entre os grupos, mas demonstraram diferenças estatísticas entre a primeira avaliação e após a terceira passagem.

Depois da dissociação enzimática com colagenase, o marcador CD45 é fortemente positivo e a medida que a cultura de células aderentes cresce, as contaminantes são eliminadas, ficando apenas as CTM, que são CD45 negativas (Figura 25).

O contrário acontece com o marcador específico de CTM. Inicialmente tem pouco no tecido e, após a terceira passagem, proliferam sendo a cultura celular um método de clareamento com a presença de células fluorescentes (Figura 25).

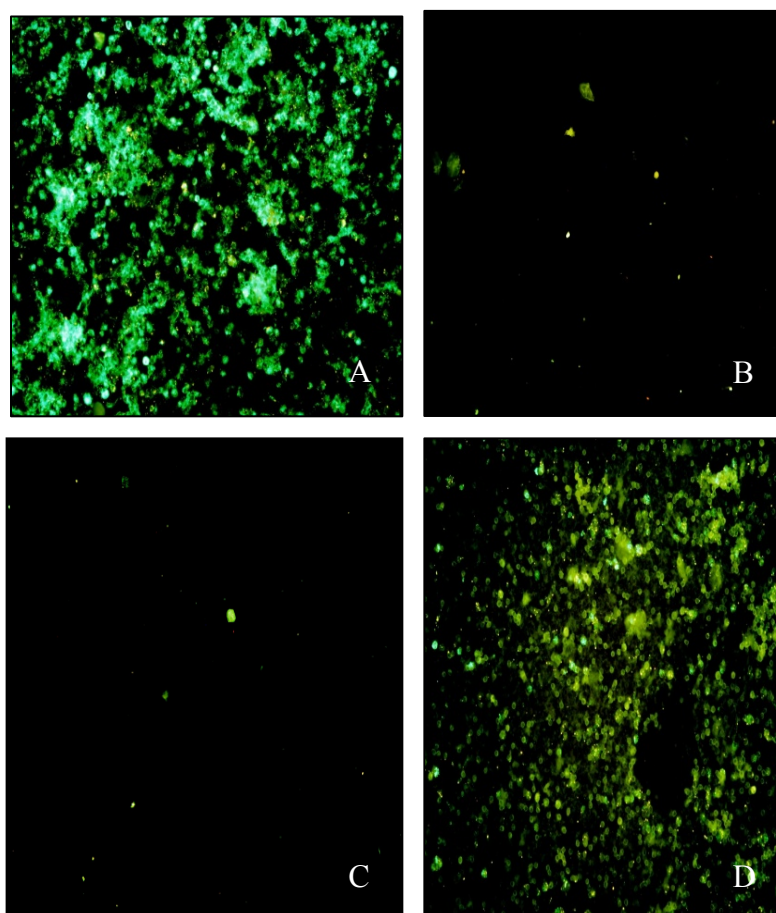


Figura 25: Teste de Imunofluorescência clássica com marcadores CD45 e CD90 pré-plaqueamento e após a terceira passagem. A – CD45 pré plaqueamento, B

– CD45 após a terceira passagem, C – CD90 pré plaqueamento, D – CD 90 após a terceira passagem.

As células-tronco mesenquimais foram diferenciadas para comprovação do potencial de diferenciação celular. Foram obtidas células adiposas, ósseas e vasculares (Figura 26).

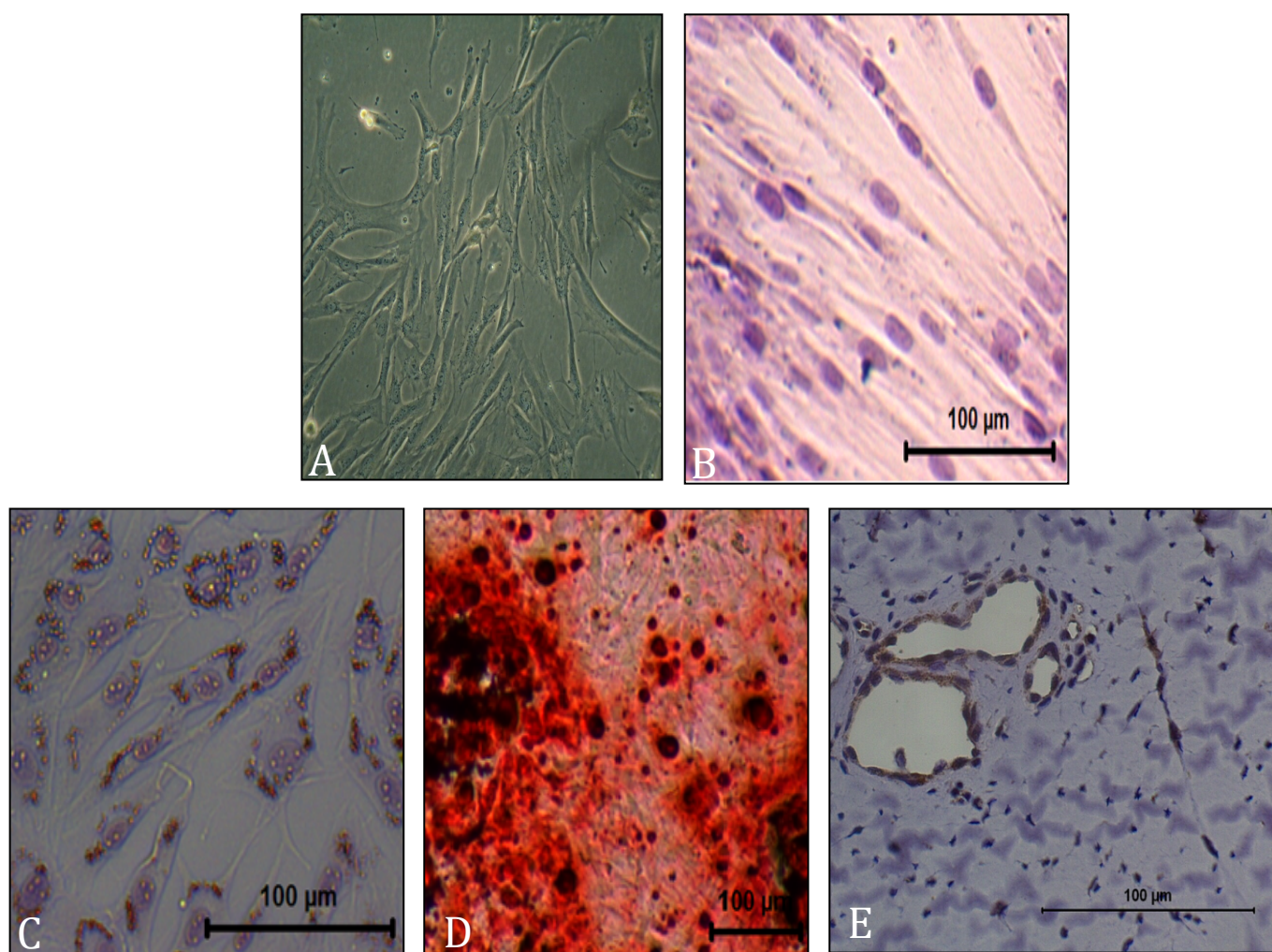


Figura 26: Fotomicrografia da cultura e diferenciação de CTM. A - teste de aderência ao plástico, aspecto de colônia de células fibroblastóides observadas por microscopia invertida de contraste de fase (aumento 20x). B - controle negativo não diferenciado, corado com Hematoxilina-eosina. C - diferenciação adipogênica corada com Oil Red onde se observam os depósitos de lipídeos em grânulos alaranjados. D - diferenciação osteogênica corado com Alizarin Red observando as deposições de cálcio e formação das trabéculas ósseas representadas em vermelho. E - diferenciação em vasos sanguíneos, corado com Hematoxilina-eosina.

#### 4.2. Exames de imagem:

Os animais foram submetidos a exame de Raio X após 30 e 60 dias de pós operatório, além de exame tomográfico aos 60 dias de pós operatório.

Nas imagens radiológicas de 30 dias, o avaliador 1 não verificou nenhuma alteração em relação ao exame normal na incidência dorso-ventral. Na incidência ântero-posterior, foi evidenciado uma imagem hiperdensa sugestiva de densidade óssea em região superior à calota craniana em apenas um animal pertencente ao Grupo 5 (Tabela 7).

O avaliador 2, também não notou diferenças nos exames dos animais quando comparado ao exame normal na incidência dorso-ventral. Em incidência ântero-posterior, notou apenas uma imagem sugestiva de densidade óssea coincidente com o animal citado pelo avaliador 1 que pertence ao Grupo 5 (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 30 dias de pós operatório, na incidência dorso-ventral e ântero-posterior, analisadas pelos avaliadores 1 e 2 (Teste Kappa).

Grupos	Rx 30 dias - DV		Rx 30 dias - AP	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
G1 – C	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G2 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G3 – O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G4 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G5 – PRP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1(6,66%) <sup>b</sup>	1(6,66%) <sup>b</sup>
G6 – PRP+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G7 – CTM	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G8 – CTM+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G9 – CTM+PRP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G10 – CTM+PRP+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G11 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G12 – AH	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

Na incidência lateral, 34 animais foram diagnosticados como apresentando imagem hiperdensa em porção superior de calota craniana para o avaliador 1. Estas imagens não puderam ser diferenciadas quanto ao lado direito ou esquerdo,

dificultando a especificidade do resultado entre os grupos que pertenciam ao mesmo animal. Assim, cinco dos animais que pertenciam aos grupos 1 e 2 apresentaram imagens positivas, cinco animais dos grupo 3 e 4, dez animais dos grupo 5 e 6, oito animais dos grupo 7 e 8, cinco animais dos grupo 9 e 10 e um dos grupo 11 e 12. Para o avaliador 2, 37 imagens foram consideradas sugestivas de densidade óssea acima da calota craniana, quatro animais pertenciam aos grupos 1 e 2, cinco aos grupo 3 e 4, nove aos grupos 5 e 6, nove aos grupos 7 e 8, seis animais dos grupo 9 e 10 e quatro dos grupos 11 e 12 (Tabela 8) (Figura 27).

Tabela 8: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 30 dias de pós operatório, na incidência lateral, analisadas pelos avaliadores 1 e 2 (Teste Kappa).

RX 30 dias - Lateral		
Grupos	Avaliador 1	Avaliador 2
G1 – C G2 – V	5 (50%) <sup>c</sup>	4 (40%) <sup>c</sup>
G3 – O G4 – V	5 (33,33%) <sup>c</sup>	5 (33,33%) <sup>c</sup>
G5 – PRP G6 – PRP+O	10 (66,66%) <sup>c</sup>	9 (60%) <sup>c</sup>
G7 – CTM G8 – CTM+O	8 (57,14%) <sup>c</sup>	9 (64,28%) <sup>c</sup>
G9 – CTM+PRP G10 – CTM+PRP+O	5 (35,71%) <sup>c</sup>	6 (42,85%) <sup>c</sup>
G11 – V G12 – AH	1 (6,66%) <sup>c</sup>	4(26,66%) <sup>c</sup>

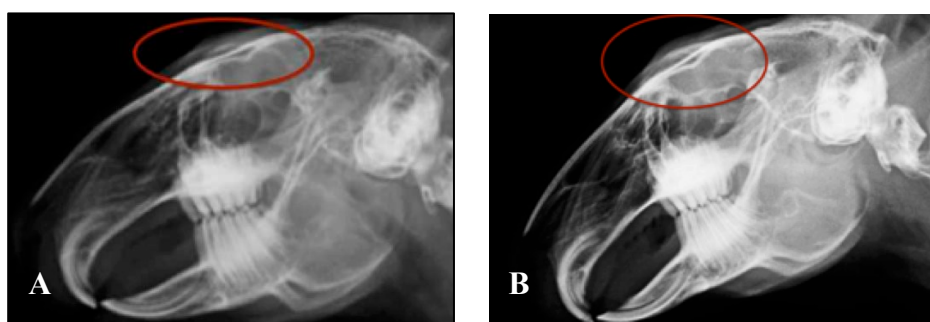


Figura 27: Raio-X em incidência lateral com imagem considerada positiva pelos dois avaliadores em região superior da calota craniana, A - correspondente ao coelho 8, que continha o Grupo 7 à direita e o Grupo 8 à esquerda. B – coelho 4, que continha o Grupo 9 à direita e o Grupo 10 à esquerda.

O restante dos animais foram considerados semelhantes ao normal, sendo negativos para formação óssea em região cranial.

Nas imagens radiológicas de 60 dias, o avaliador 1 identificou imagem hiperdensa no lado direito de um animal na incidência dorso-ventral, correspondente ao Grupo 7, com retalho preenchido com células-tronco mesenquimais. Na imagem ântero-posterior apenas um animal foi considerado com imagem sugestiva de densidade óssea, lado direito, este animal pertence ao Grupo 3 (Tabela 9) (Figuras 28 e 29).

Para o avaliador 2, um animal foi identificado com imagem hiperdensa no lado direito da calota craniana na incidência dorso-ventral, o mesmo animal do Grupo 7, também considerado com imagem positiva pelo avaliador 1. Em ântero-posterior, um animal do Grupo 3 foi considerado positivo, o mesmo citado pelo avaliador 1 (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados obtidos nas imagens radiográficas de crânio após 60 dias de pós operatório, na incidência dorso-ventral e ântero-posterior analisadas pelos dois avaliadores (Teste Kappa).

Grupos	Rx 60 dias - DV		Rx 60 dias - AP	
	Avaliador 1	Avaliador 2	Avaliador 1	Avaliador 2
G1 – C	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G2 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G3 – O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1 (6,66%) <sup>b</sup>	1 (6,66%) <sup>b</sup>
G4 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G5 – PRP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G6 – PRP+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G7 – CTM	1 (7,14%) <sup>a</sup>	1 (7,14%) <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G8 – CTM+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G9 – CTM+PRP	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G10 – CTM+PRP+O	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G11 – V	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
G12 – AH	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>



Figura 28: Raio-X dorso-ventral considerado pelos avaliadores como positivo para a imagem hiperdensa em lado direito de calota craniana, correspondente ao coelho 6 – Grupo 7. A letra R corresponde ao lado direito do animal.

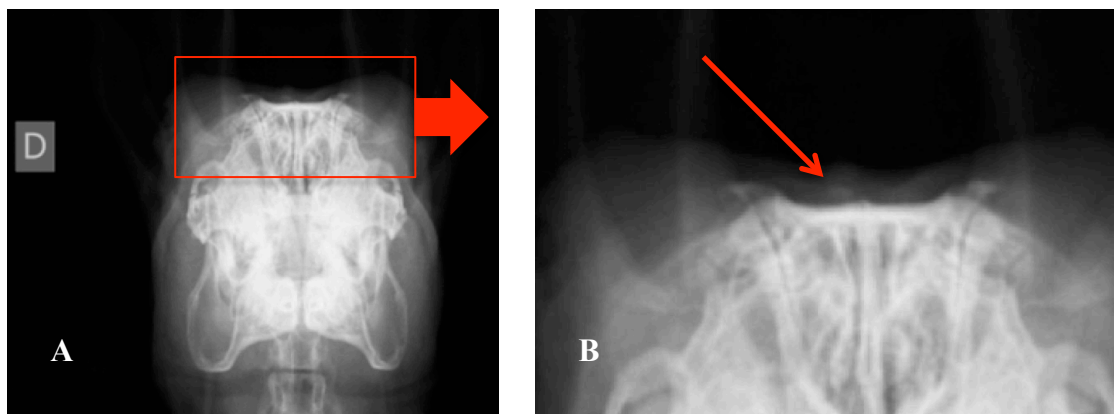


Figura 29: Raio-X na incidência ântero-posterior considerada positiva pelos avaliadores. A – imagem puntiforme em porção superior da calota craniana, lado direito, evidenciada pelo retângulo vermelho. B – Área do retângulo em maior aumento, evidenciando a imagem hiperdensa em região cranial direita.

Nas imagens laterais de 60 dias, 41 animais foram considerados com a presença de imagem hiperdensa em porção superior de calota craniana para o avaliador 1. Cinco faziam parte dos Grupos 1 e 2, nove animais pertenciam aos Grupos 3, 4, 7 e 8, dez animais eram dos Grupos 5 e 6 e quatro animais pertenciam aos Grupos 9, 10, 11 e 12. Para o avaliador 2, 41 exames foram considerados

positivos para imagem hiperdensa, sendo os Grupos 1, 2, 3 e 4 contendo seis animais, os Grupos 5 e 6 com 12 animais, Grupos 7 e 8 com 10, Grupos 9 e 10 com 3 e Grupos 11 e 12 com 4 animais cada (Tabela 10).

Tabela 10: Resultados obtidos nas imagens radiográficas após 60 dias de pós operatório, na incidência lateral, analisadas pelos avaliadores 1 e 2 (Teste Kappa).

RX 60 dias - Lateral		
Grupos	Avaliador 1	Avaliador 2
G1 – C G2 – V	5 (50%) <sup>c</sup>	6 (60%) <sup>c</sup>
G3 – O G4 – V	9 (60%) <sup>c</sup>	6 (40%) <sup>c</sup>
G5 – PRP G6 – PRP+O	10 (66,66%) <sup>c</sup>	12 (80%) <sup>c</sup>
G7 – CTM G8 – CTM+O	9 (64,28%) <sup>c</sup>	10 (71,42%) <sup>c</sup>
G9 – CTM+PRP G10 – CTM+PRP+O	4 (28,57%) <sup>c</sup>	3 (21,43%) <sup>c</sup>
G11 – V G12 – AH	4 (26,66%) <sup>c</sup>	4 (26,66%) <sup>c</sup>

O restante dos animais foram considerados semelhantes ao normal, sendo negativos para formação óssea em região cranial aos 60 dias de pós operatório.

Foi realizado um teste de concordância entre as respostas dos avaliadores e as medidas de lateral e ântero-posterior. Na incidência lateral, Kappa = 0,018, e na incidência ântero-posterior, Kappa = 0 o que demonstra pouca concordância entre eles (Gráficos 1 e 2).

Dentro de cada cada grupo e em cada tempo (30 e 60) não houve diferença estatística.

Gráfico 1: Comparação dos resultados positivos encontrados nas radiografias de crânio no pós operatório de 30 dias.

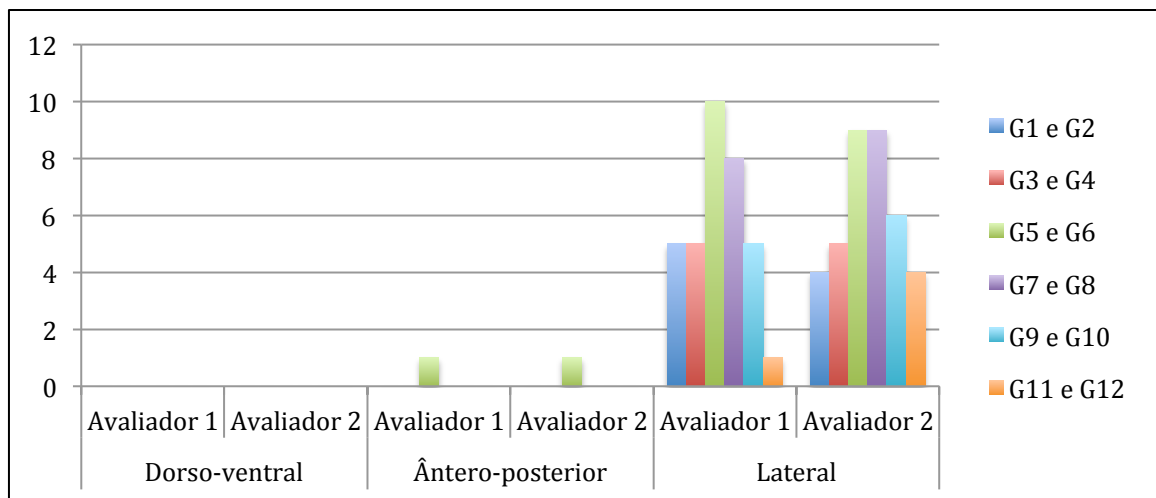
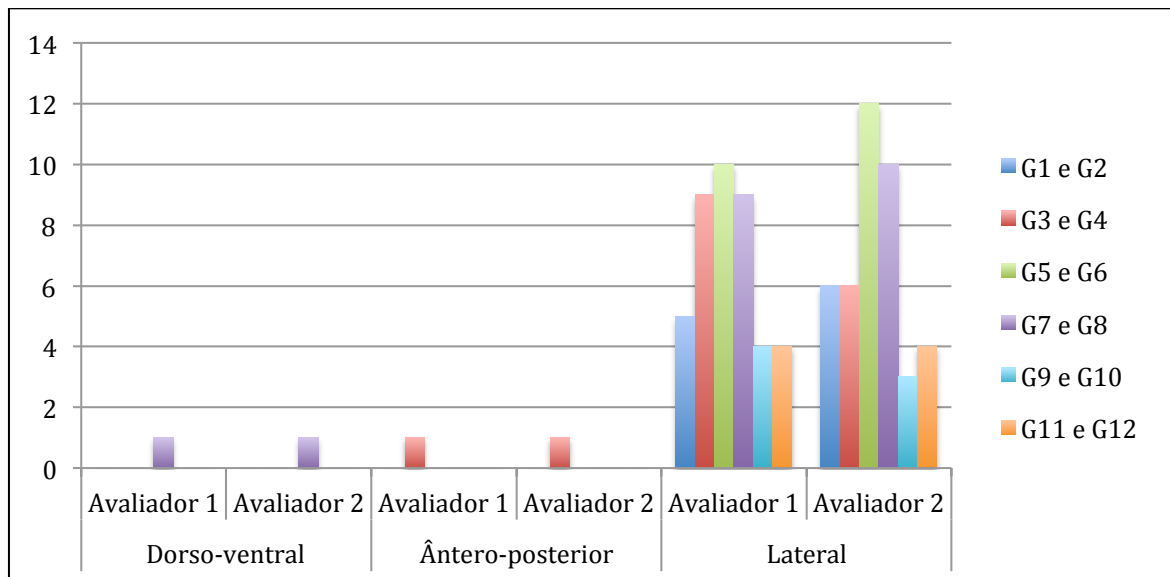


Gráfico 2: Comparação dos resultados positivos encontrados nas radiografias de crânio no pós operatório de 60 dias.



Os exames tomográficos foram avaliados por um avaliador, em cortes coronais de 1 mm, reconstrução tridimensional de partes moles e reconstrução óssea tridimensional através do programa Osirix.v.5.8.2.

Nos cortes coronais, uma imagem espiculada em região cranial foi visibilizada em 6 animais do lado direito e 1 animal do lado esquerdo. No lado direito, um animal

pertencia ao Grupo 1, dois ao Grupo 3, um ao Grupo 5, um do Grupo 7 e um do Grupo 9. O animal que apresentou a imagem à esquerda pertencia ao Grupo 6 (Tabela 11) (Figuras 30 e 31).

Tabela 11: Resultado de imagens tomográficas em região cranial, cortes coronais, dividida entre os grupos estudados.

Grupos	Imagem tomográfica
G1 – C	1
G2 – V	0
G3 – O	2
G4 – V	0
G5 – PRP	1
G6 – PRP+O	1
G7 – CTM	1
G8 – CTM+O	0
G9 – CTM+PRP	1
G10 – CTM+PRP+O	0
G11 – V	0
G12 – AH	0

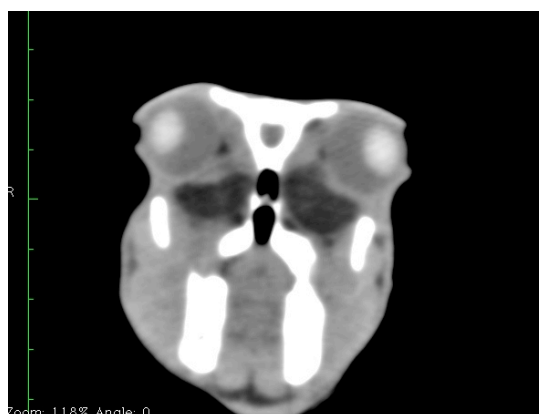


Figura 30: Imagem coronal de tomografia de crânio do coelho 4 – Grupos 9 e 10, ausência de imagem que evidencie formação óssea em região cranial da calota craniana.

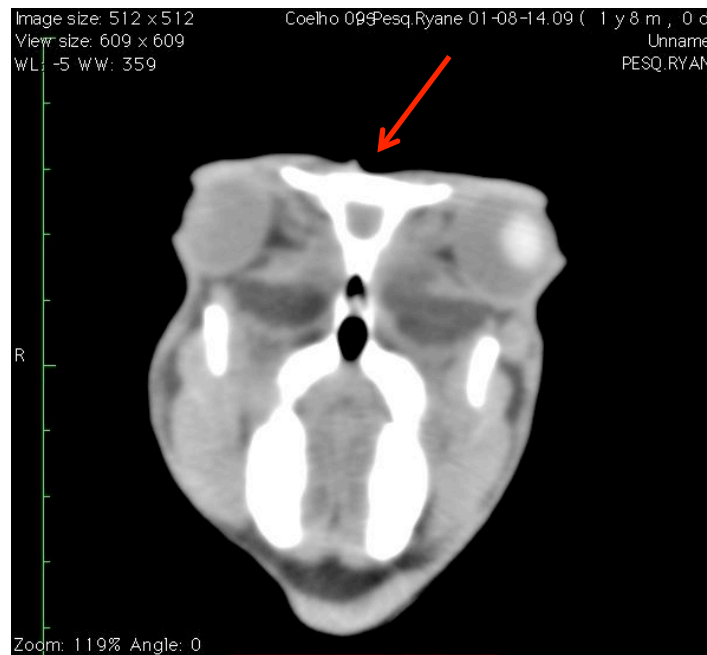


Figura 31: Corte coronal de tomografia computadorizada de crânio do coelho 8 – Grupos 7 e 8, com imagem em região cranial direita de calota craniana correspondente ao Grupo 7.

Esta imagem caracteriza-se por uma elevação na região superior da calota craniana, com densidade de partes moles, não há evidência de imagem hiperdensa. Pode corresponder a tecido mole ou reação inflamatória como causa do abaulamento na superfície cranial. As imagens foram todas analisadas através de escala HU (unidade Hounsfield) para avaliação da densidade tecidual conforme a variação da escala de cinza, mas nenhuma das imagens encontradas corresponderam à densidade óssea (Anexo 3).

Os exames tomográficos de todos os animais foram convertidos para imagem tridimensional de partes moles e ósseas. Quanto à imagem 3D completa, incluindo partes moles, há a presença de duas imagens paralelas elevadas que sugerem a formação óssea almejada através dos retalhos de gálea e periósteo, no entanto, todos os animais apresentaram a imagem semelhante e, quando comparadas com as imagens tridimensionais ósseas é possível notar que a formação encontrada correlaciona-se a formação óssea craniana normal do coelho (Figura 32).

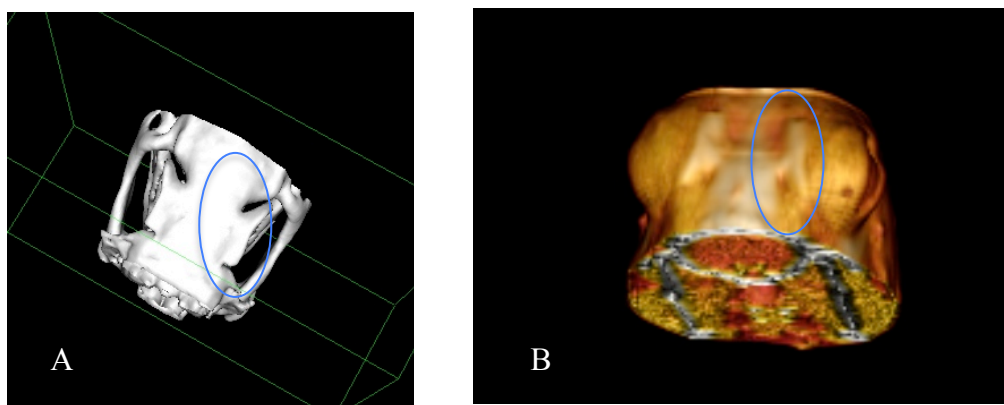


Figura 32: Tomografia computadorizada de crânio do coelho 4 – Grupos 9 e 10. A - imagem 3D de partes ósseas e B - imagem 3D de partes moles.

As imagens tridimensionais ósseas apresentaram uma depressão no osso da calota craniana com tamanho variável de pequeno a grande, unilateral ou bilateral.

Ocorreram depressões ósseas unilaterais em 28 animais, destes, 11 ocorreram à esquerda, 14 à direita e 3 em região central. Quatorze animais apresentaram depressão óssea bilateral (Figura 33). As depressões não tiveram relação com os lados e animais onde foi realizada raspagem de osso da calota craniana para a obtenção de pó de osso.

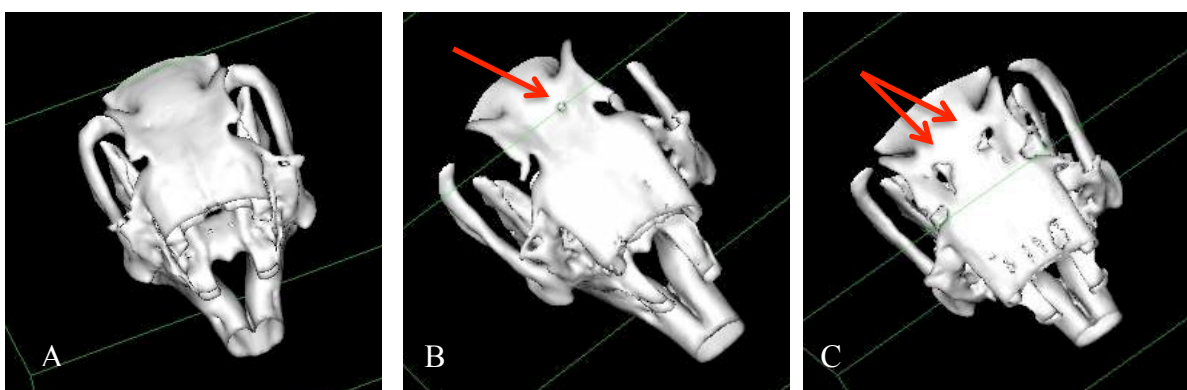


Figura 33: Tomografias computadorizadas em imagens tridimensionais do crânio dos coelhos. A – Coelho 88 (Grupos 11 e 12), sem deformidade da calota craniana. B – Coelho 55 (Grupos 1 e 2), depressão pequena e unilateral, mesmo sem manipulação óssea durante o ato operatório. C - Coelho 91 (Grupos 9 e 10), com depressão grande bilateralmente na calota craniana.

Não houve evidência de formação óssea no local operado pelas imagens tomográficas.

#### 4.3. Avaliação histológica:

Após o exame tomográfico, a incisão mediana foi realizada novamente e o retalho foi identificado. Neste momento foram analisados macroscopicamente, com identificação da presença de sangramento em todas as amostras, demonstrando a vascularização e viabilidade dos retalhos tubulares com pedículo vascular.

Na inspeção, não se observou a presença de secreção ou exsudato afastando a presença de quadros infecciosos.

A avaliação semi-quantitativa celular foi realizada por dois avaliadores que quantificaram em uma cruz (+) a três cruces (+++) a presença de osteócitos, osteoblastos, vascularização, calcificação e organização celular em lâminas com três cortes de cada amostra (Tabela 12). Não houve diferença entre os examinadores ( $p=0,8311$ ,  $p=0,8357$ ,  $p=0,6990$ ,  $p=0,6856$ ,  $p=0,9785$ ).

Tabela 12: Avaliação semi-quantitativa dos avaliadores 1 e 2 quanto a presença de osteócitos, osteoblastos, vascularização, calcificação e organização celular em porcentagem (%).

	Avaliador 1			Avaliador 2		
	+	++	+++	+	++	+++
Osteócitos	51,61	37,09	11,29	53,22	38,71	8,06
Osteoblastos	75,81	24,19	0	74,19	25,81	0
Vascularização	66,13	27,42	6,45	59,67	30,64	9,67
Calcificação	46,77	35,48	17,74	53,22	33,87	12,91
Organização celular	53,22	29,03	17,74	54,83	27,42	17,74

A avaliação quantitativa foi realizada através das medidas de área, perímetro e volume da estrutura óssea neoformada nas lâminas coradas com Hematoxilina-eosina. As medidas foram realizadas no programa *Sigma Scan Pro 5*, após calibração adequada em aumento de 2,5x. Na coloração de Tricrômio de Masson, foi realizada a análise da formação óssea através da coloração azulada e distribuição dos elementos celulares.

Nas lâminas foi possível caracterizar células adiposas, tecido muscular e uma rede vascular que comprova a vascularização efetiva do retalho, importante para a manutenção e formação celular (Figura 34).

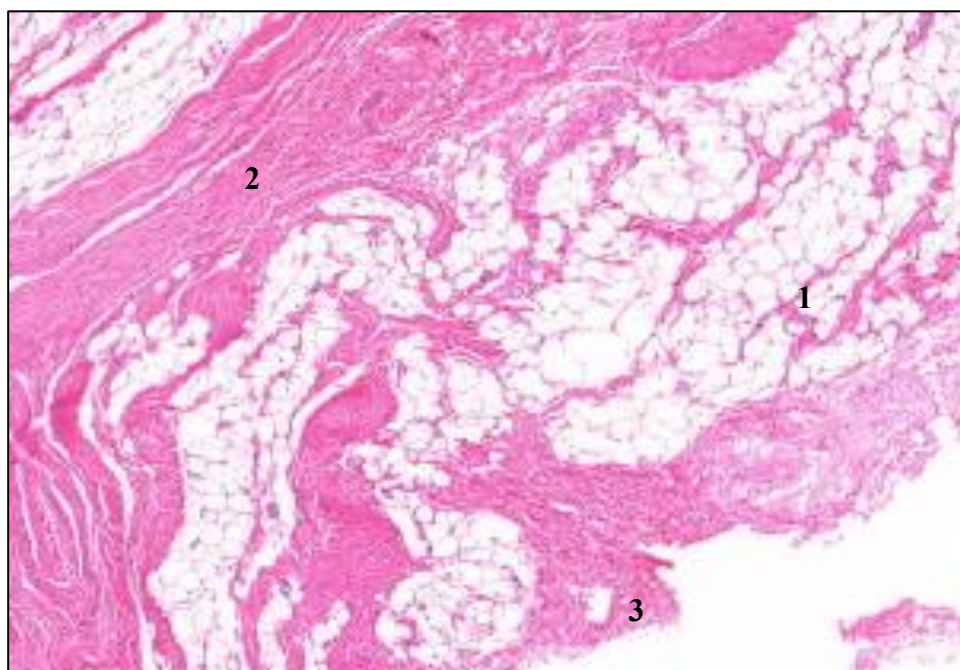


Figura 34: Retalho de gálea e periósteo, corado com hematoxilina-eosina, demonstrando tecido adiposo (1), muscular (2) e vascularização tecidual (3) (10x).

O Grupo 1 ou grupo controle, não manipulado, não apresentou nenhuma formação óssea.

O Grupo 2, em que foi realizado o retalho de gálea e periósteo vazio, foram encontradas imagens de osso neoformado em seis animais (60%) e os quatro animais restantes não apresentaram imagem óssea. Nas formações ósseas encontradas, três apresentaram áreas maiores que 2 mm<sup>2</sup>, no entanto, a organização óssea demonstrou

osteócitos ao acaso, formato irregular e pouco ou nenhum osteoblasto ao redor, mas com a presença de vascularização na matriz óssea (Figura 35) (Tabela 13).

Foi demonstrado diferença estatística quanto à formação óssea entre os Grupos 1 e 2 ( $p=0,0084$ ).

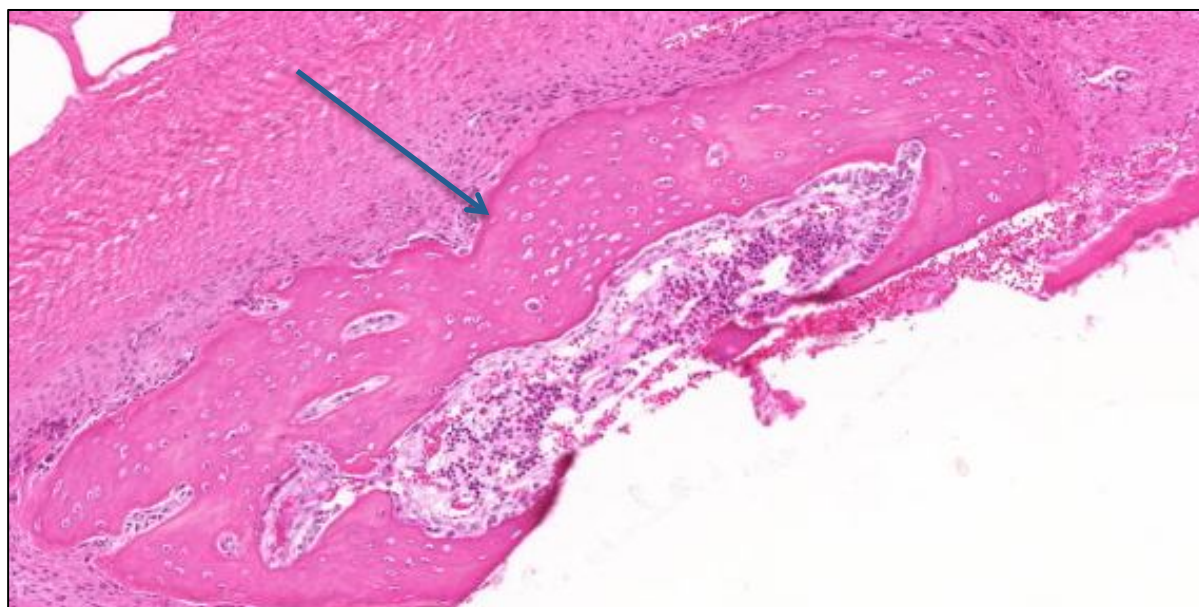


Figura 35: Coelho 10, Grupo 2 (10x). Imagem óssea neoformada com bordos irregulares, vascularização dentro da matriz óssea, osteócitos ao acaso, não organizados.

Tabela 13: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 2.

Grupo 2			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
10	4,68	0,19	430,42
21	0,83	0,05	36,42
23	0,68	0,07	14,45
28	7,37	0,14	795,98
30	2,49	0,07	205,14
52	0,76	0,04	29,80

No Grupo 3, onde o retalho tubular foi introduzido com pó de osso da calota craniana, apresentou cinco animais (33,33%) com formação óssea, pequena e irregular, apenas o coelho 51 apresentou uma imagem óssea com área maior que 5 mm<sup>2</sup> (Figura 36) (Tabela 14).

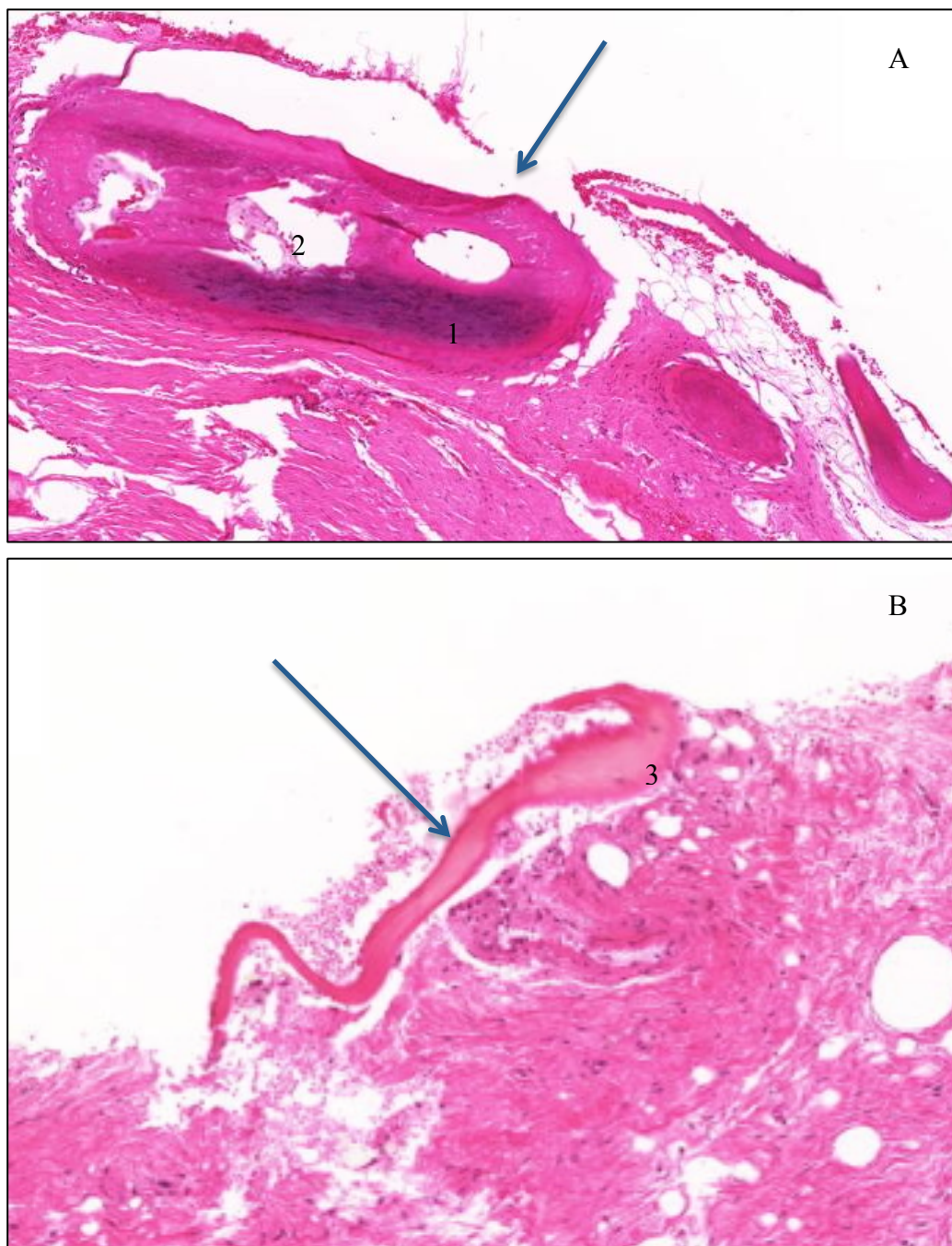


Figura 36: A – Coelho 51, Grupo 3 (10x). Imagem irregular, osteócitos ao acaso (1) e vascularização interna (2). B – Coelho 14, Grupo 3 (10x). Formação óssea irregular, pequena, sem vascularização interna, poucos osteócitos ao acaso (3).

Tabela 14: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 3.

Grupo 3			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
13	0,95	0,08	26,79
14	0,37	6,26	6,26
20	0,24	0,05	2,29
27	0,48	0,09	4,85
51	5,36	0,18	439,47

Quanto ao Grupo 4, onde apenas foi realizado o retalho tubular de gálea e perióstio vazio, foram encontradas formações ósseas em 7 animais (46,66%), pequenas, irregulares com pouca ou sem vascularização no interior do tecido ósseo neoformado, poucos osteócitos e nenhum osteoblasto ao redor (Figura 37) (Tabela 15).

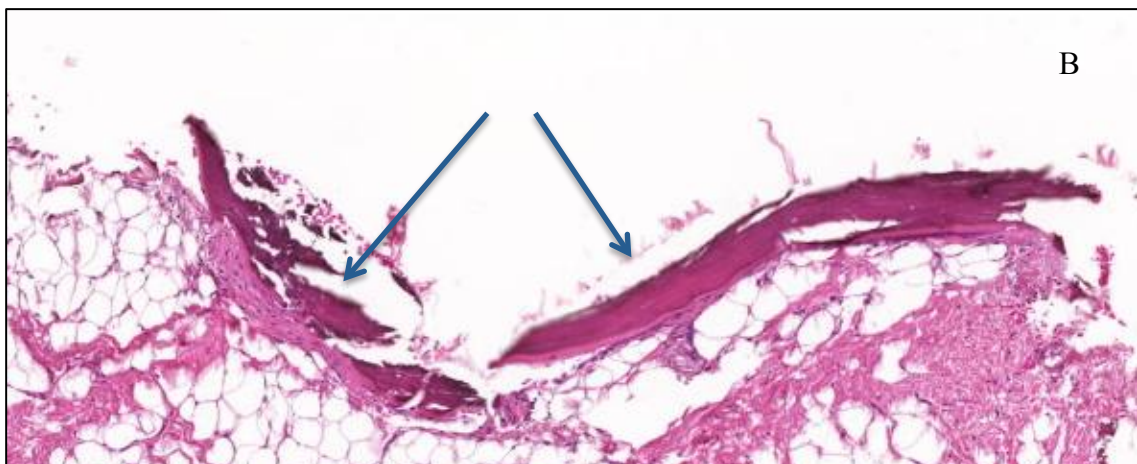
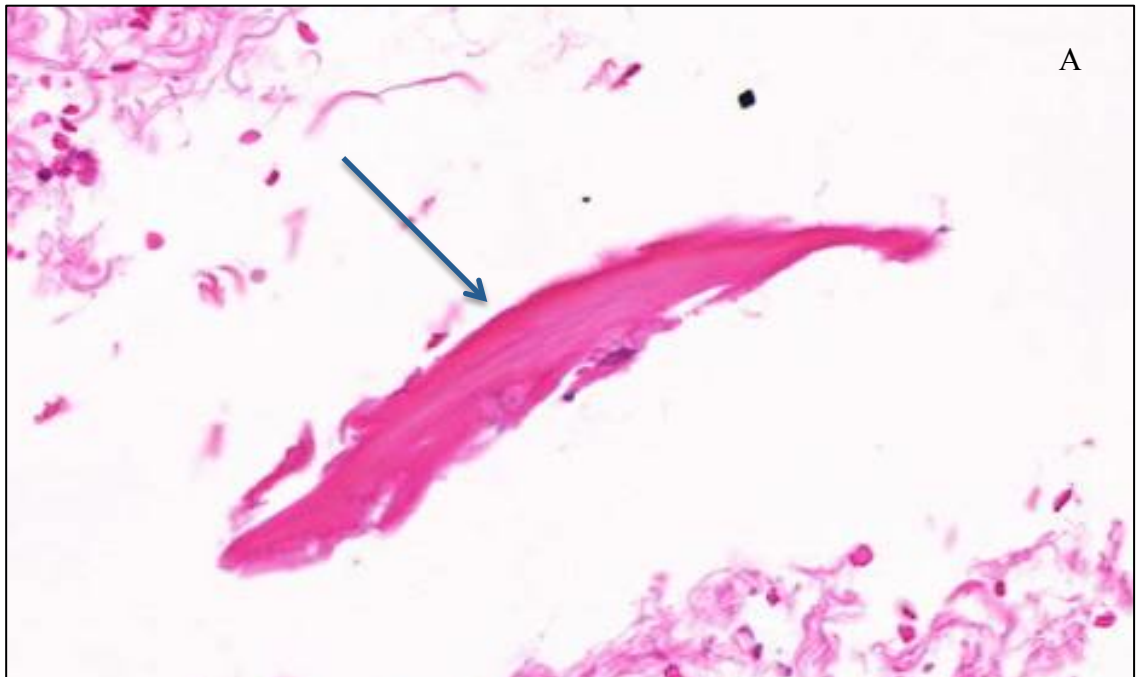


Figura 37: A – Coelho 36, Grupo 4. Imagem da formação óssea pequena e irregular (10x). B – Coelho 22, Grupo 4. Formação óssea irregular, estreita, pouco organizada (10x).

Tabela 15: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 4.

Grupo 4			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
13	0,33	0,05	4,48
14	1,66	0,15	42,86
20	1,91	0,09	93,24
22	1,10	0,12	18,01
36	0,95	0,07	24,00
72	3,74	0,08	387,24
73	0,73	0,06	14,90

Nos Grupos 3 e 4 não houve diferença estatística quanto à presença de formação óssea ( $p=0,2234$ ).

No Grupo 5, foi realizado retalho tubular de gálea e periósteo preenchido com plasma rico em plaquetas (PRP) e encontrado 53,33% de formação óssea. Oito entre os quinze animais apresentaram tecido ósseo irregular, com poucos osteócitos ao acaso, não organizados e com pouca vascularização (Figura 38) (Tabela 16).

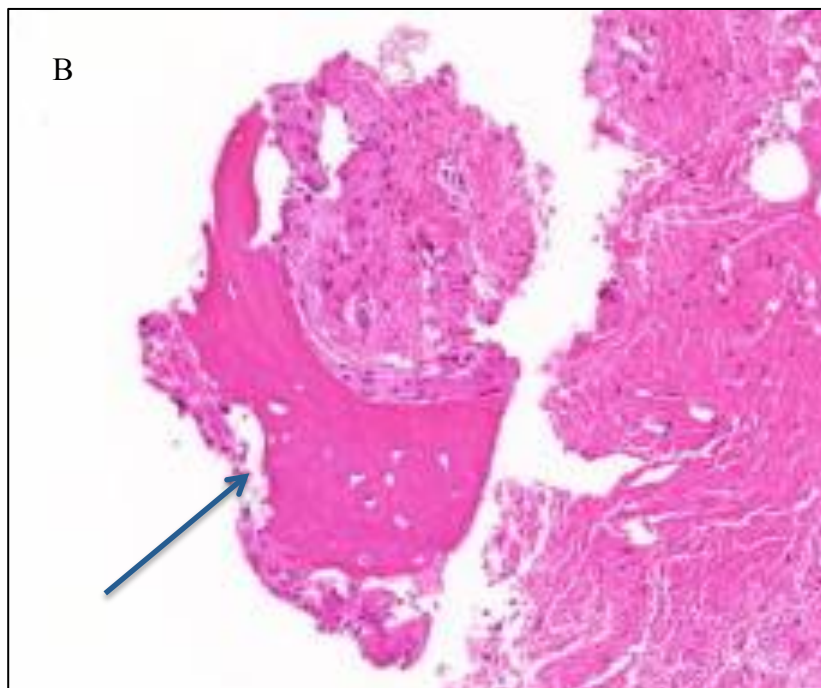
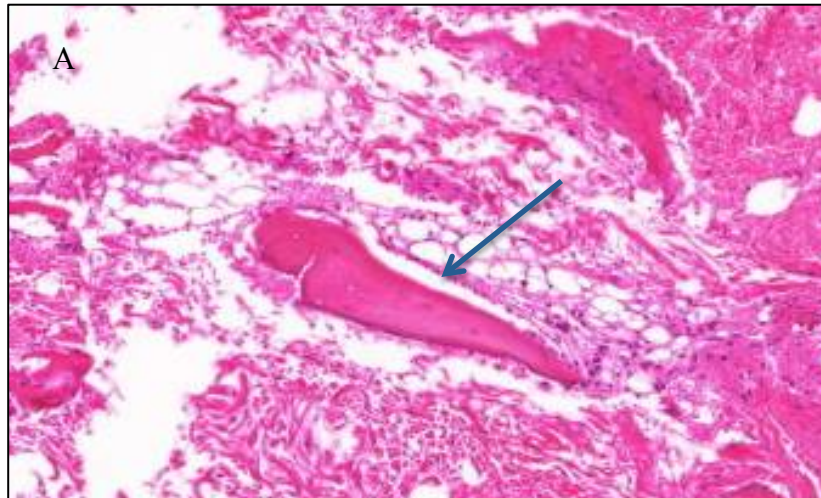


Figura 38: A – Coelho 16, Grupo 5. B – Coelho 17, Grupo 5. Formações ósseas pequenas, irregulares com poucos osteócitos (10x).

Tabela 16: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 5.

Grupo 5			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
5	0,35	0,07	2,46
12	0,21	0,02	4,37
16	0,34	0,05	6,77
17	0,48	0,04	16,91
32	1,09	0,05	50,23
76	0,67	0,14	24,76
80	0,28	0,04	4,53
97	0,51	0,04	16,05

No Grupo 6, onde foi associado o pó de osso ao PRP, nove animais apresentaram tecido ósseo ao exame histológico (60%). A formação óssea apresenta maior organização comparada aos grupos anteriores, maior regularidade de forma, maior número de osteócitos no interior do tecido, além de vasos na matriz óssea e presença de osteoblastos periféricos (Figura 39) (Tabela 17).

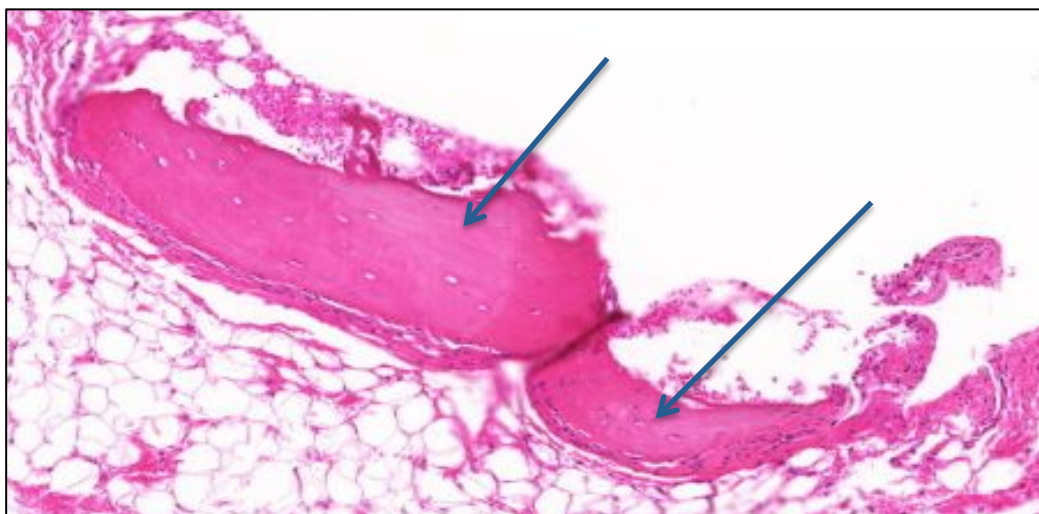
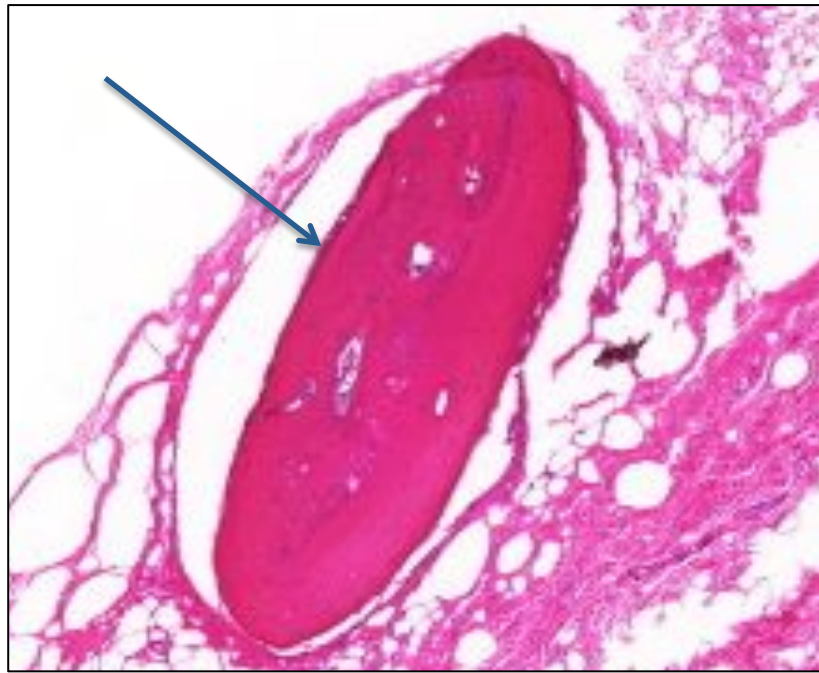


Figura 39: Coelhos 11, 15 e 17, respectivamente, pertencentes ao Grupo 6 (10x).

Tabela 17: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 6.

Grupo 6			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
9	4,24	0,20	239,36
11	0,21	0,02	4,39
12	0,77	0,05	22,08
15	5,17	0,10	516,34
16	0,32	0,03	6,85
17	1,71	0,08	72,16
76	0,51	0,03	20,54
84	5,69	0,24	372,03
97	0,37	0,02	11,22

Nos Grupos 5 e 6, não houve diferença estatística da presença de formação óssea entre eles ( $p=0,2689$ ).

No Grupo 7, o retalho foi enriquecido com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo associado a ácido hialurônico para permitir a manipulação e inclusão das CTM no interior do retalho. Sete dos quinze animais (46,66%) apresentaram formação óssea no estudo histológico com tecido ósseo mais organizado, maior número de osteócitos e vasos no interior da matriz óssea, bem delimitado e com osteoblastos na periferia (Figuras 40 e 41) (Tabela 18).

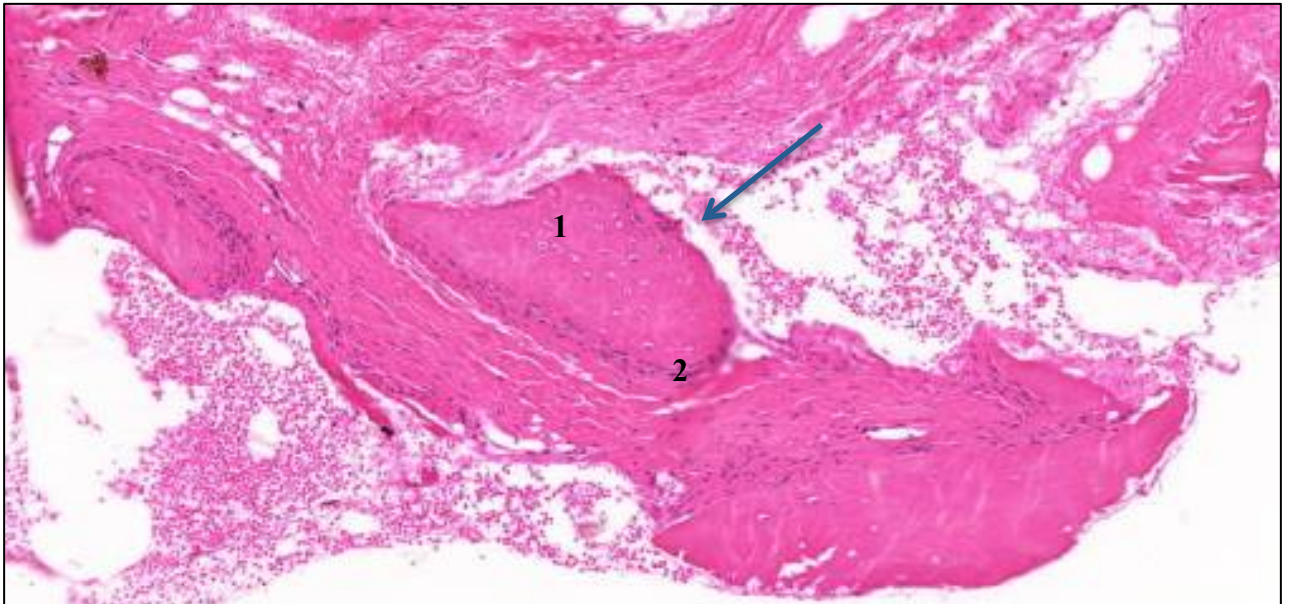


Figura 40: Coelho 6, Grupo 7 (10x). Formação óssea com maior número de osteócitos (1) e osteoblastos na periferia (2).

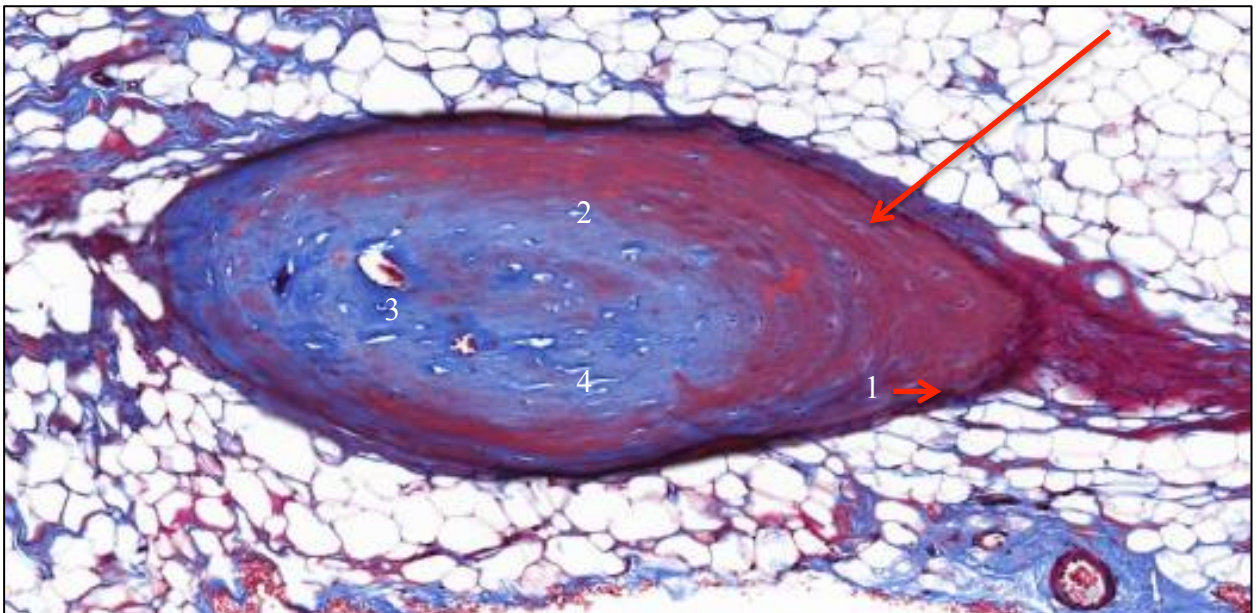


Figura 41: Coelho 58, Grupo 7 (10x). Estudo histológico do tecido tubular da calota craniana, na coloração Tricrômio de Massom, demonstrando a forma regular, bem delimitada, envolta por osteoblastos (1), com osteócitos (2) e vasos no interior (3) e a coloração azulada que indica áreas de ossificação (4).

Tabela 18: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 7.

Grupo 7			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
6	2,05	0,15	37,93
8	0,48	0,04	13,80
58	4,04	0,08	394,15
67	0,58	0,03	21,28
70	2,84	0,11	152,16
95	2,14	0,11	129,48
96	1,29	0,04	77,68

No Grupo 8, as células-tronco mesenquimais e o ácido hialurônico foram associados ao pó de osso, destes animais, 40% mostraram formação óssea no estudo histológico. Destes seis animais com tecido ósseo formado, quatro apresentaram imagens bem organizadas, arredondadas e as outras duas também tinham tecido ósseo com osteócitos, osteoblastos, vascularização, mas a forma não era arredondada, apresentava uma forma mais irregular (Figura 42) (Tabela 19).

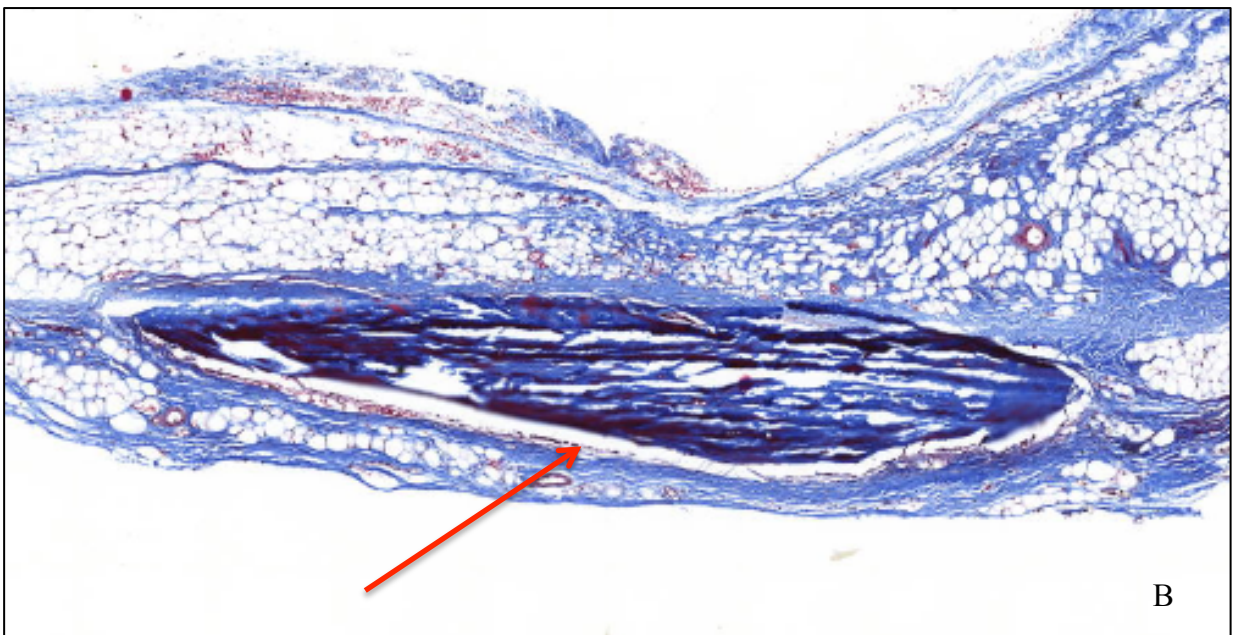
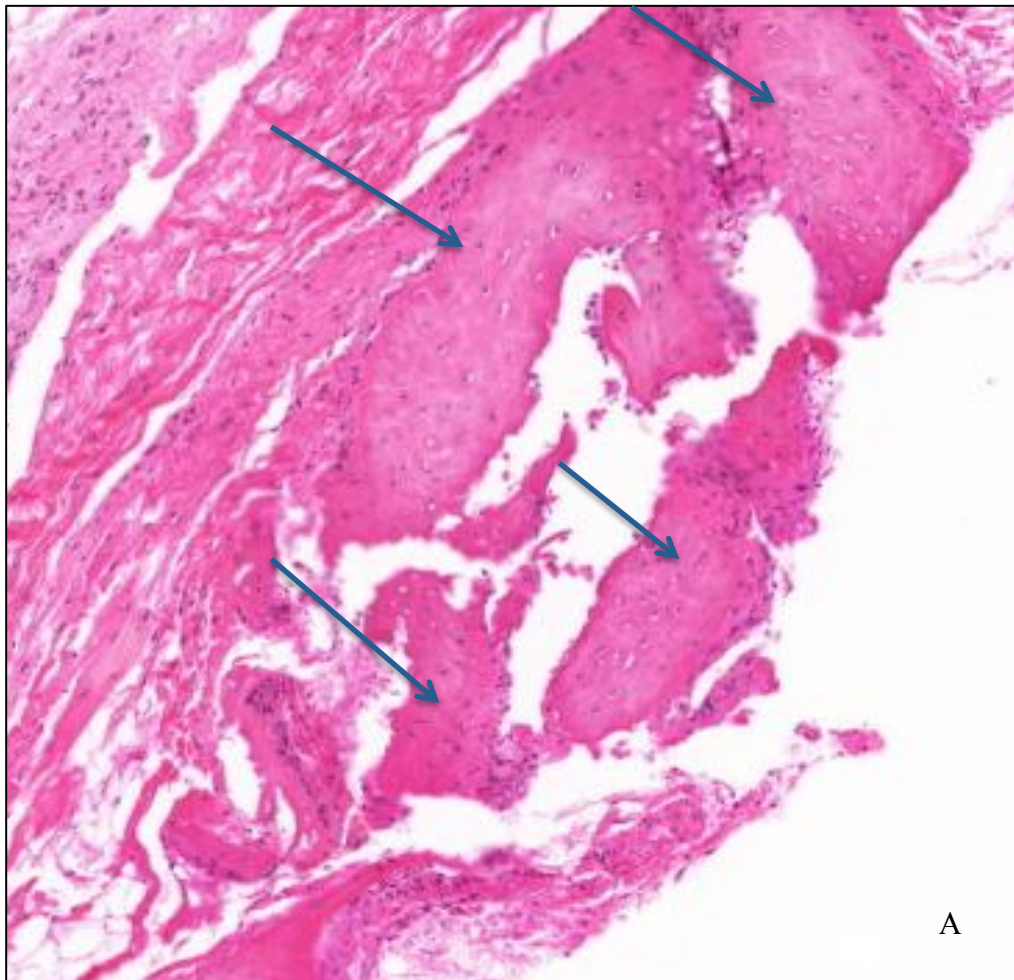


Figura 42: A – Coelho 8, Grupo 8 (10x). Formação óssea com grande quantidade de osteócitos e forma irregular. B – Coelho 95, Grupo 8 (10x) na coloração Tricrômio de Massom com imagem bem organizada e delimitada, além da presença de ossificação.

Tabela 19: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 8.

Grupo 8			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
6	0,89	0,11	22,35
8	3,42	0,20	197,71
58	3,23	0,10	274,37
69	0,09	0,02	0,89
95	0,09	0,02	0,89
96	6,01	0,14	498,30

Nos Grupos 7 e 8, também não houve diferença estatística na presença de formação óssea entre eles ( $p=0,2753$ ).

O Grupo 9, com PRP e CTM, apresentou formação óssea em 5 animais (35,71%), em todos foram encontrados tecidos ósseos bem formados, delimitados, circunferenciais, com osteócitos organizados e paralelos, lacunas com formação vascular no interior da matriz óssea e vasos periféricos ao redor, que indicam boa vascularização, tecido ósseo maduro com lamelas paralelas (Figura 43) (Tabela 20).

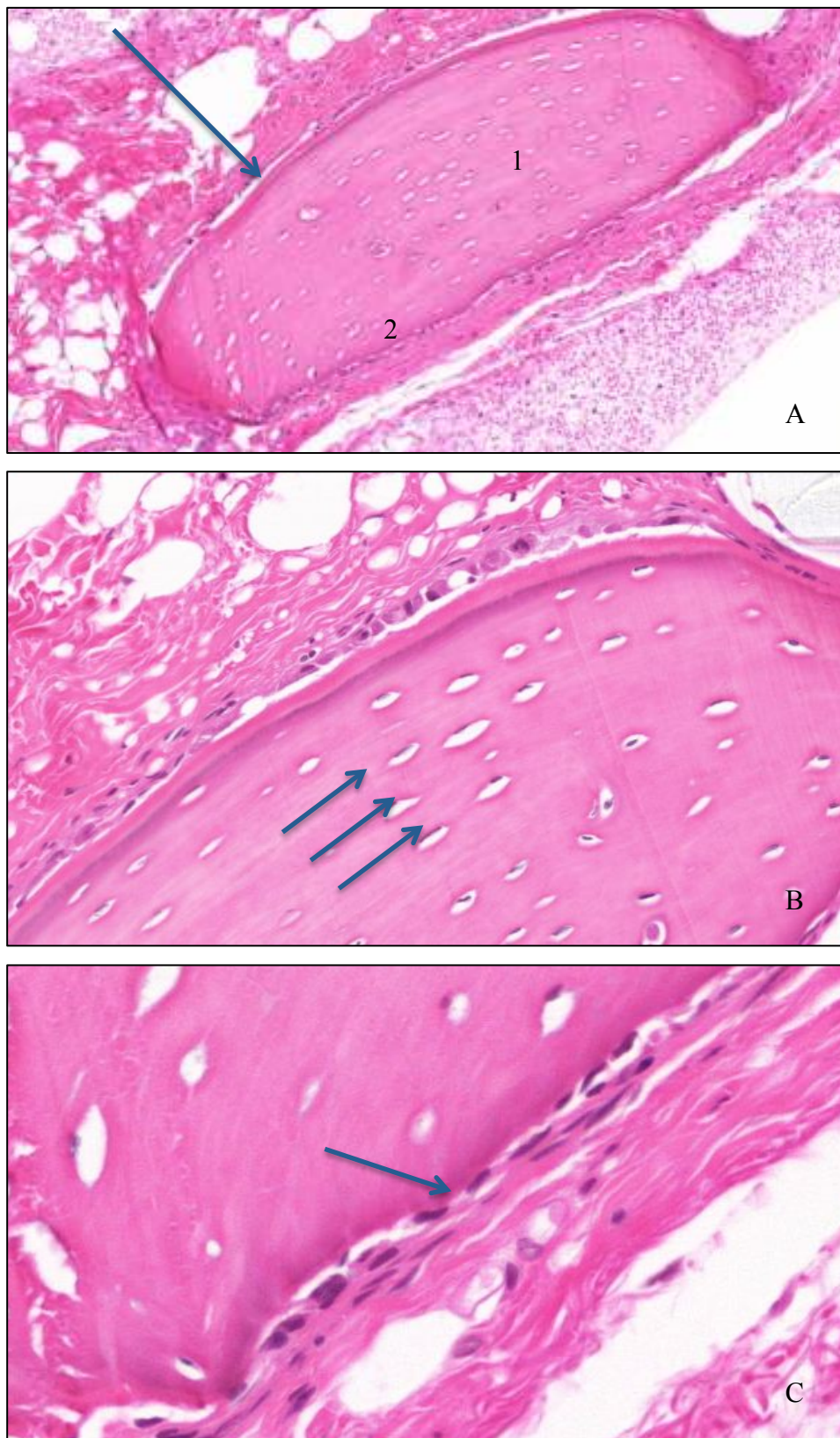


Figura 43: Coelho 5, Grupo 9. A – Formação óssea bem delimitada, organizada, com muitos osteócitos paralelos, lamelas paralelas (1), rima periférica de osteoblastos (2)(10x). B - Organização celular dos osteócitos (20x). C – Região periférica onde localizam-se osteoblastos (40x).

Tabela 20: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 9.

Grupo 9			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
5	2,22	0,07	179,86
39	0,62	0,05	14,21
42	0,11	0,02	1,25
44	1,52	0,11	48,64
92	1,38	0,08	52,00

No Grupo 10, com a introdução de CTM, PRP e pó de osso, 50% das amostras apresentaram tecido ósseo bem formado com lamelas paralelas, formato circunferencial, com osteócitos organizados e paralelos, formação vascular no interior da matriz óssea e vasos periféricos ao redor. O tecido ósseo tem aspecto maduro (Figuras 44 - 47) (Tabela 21).

Na coloração Tricrômio de Massom a coloração central azulada demonstra depósito de cálcio na formação de tecido ósseo (Figura 44).

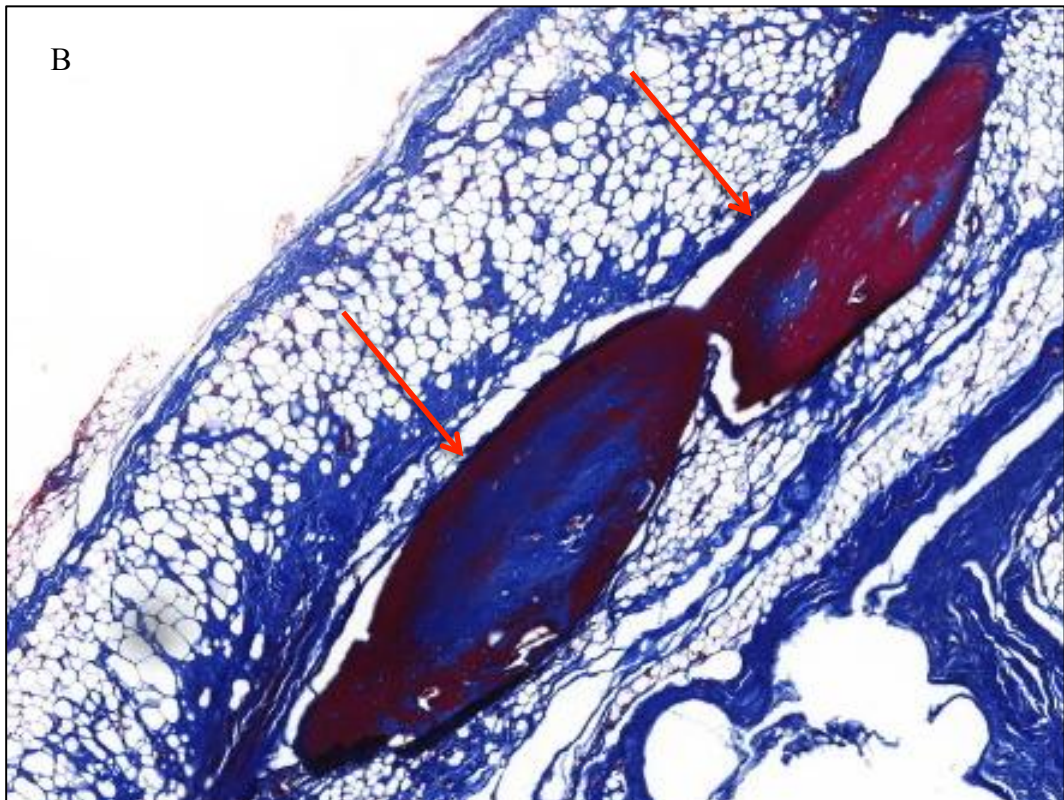
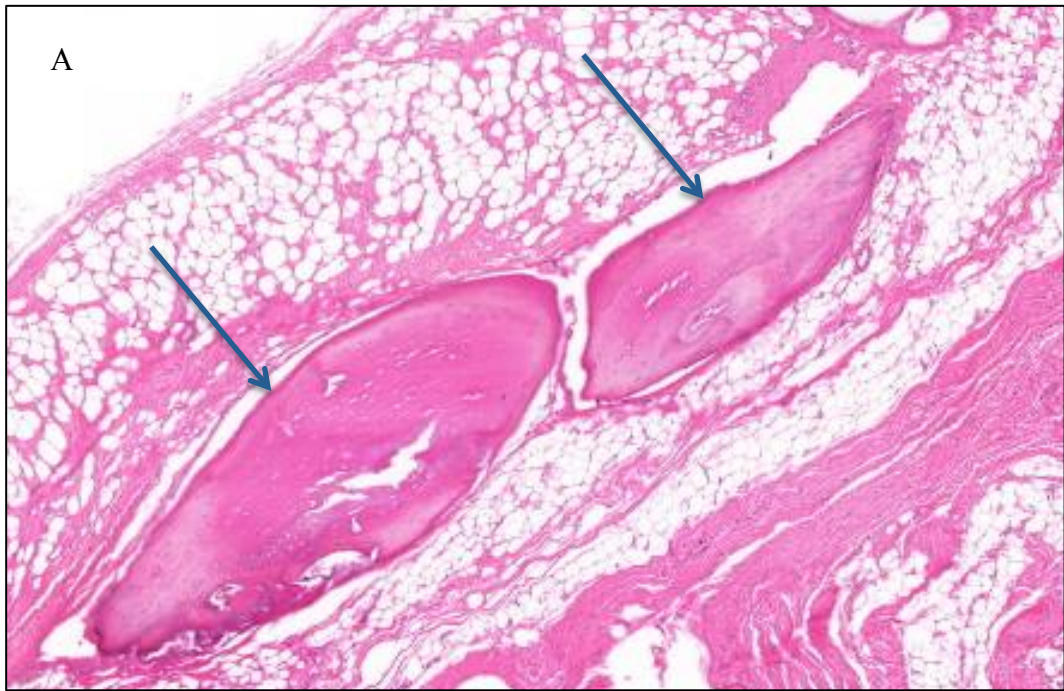


Figura 44: Coelho 4, Grupo 10 (10x). Imagens do tecido ósseo formado. A - Hematoxilina-eosina e B - Tricrômio de Massom. Verifica-se a formação óssea organizada, bem delimitada, com vascularização, osteócitos paralelos e ossificação central.

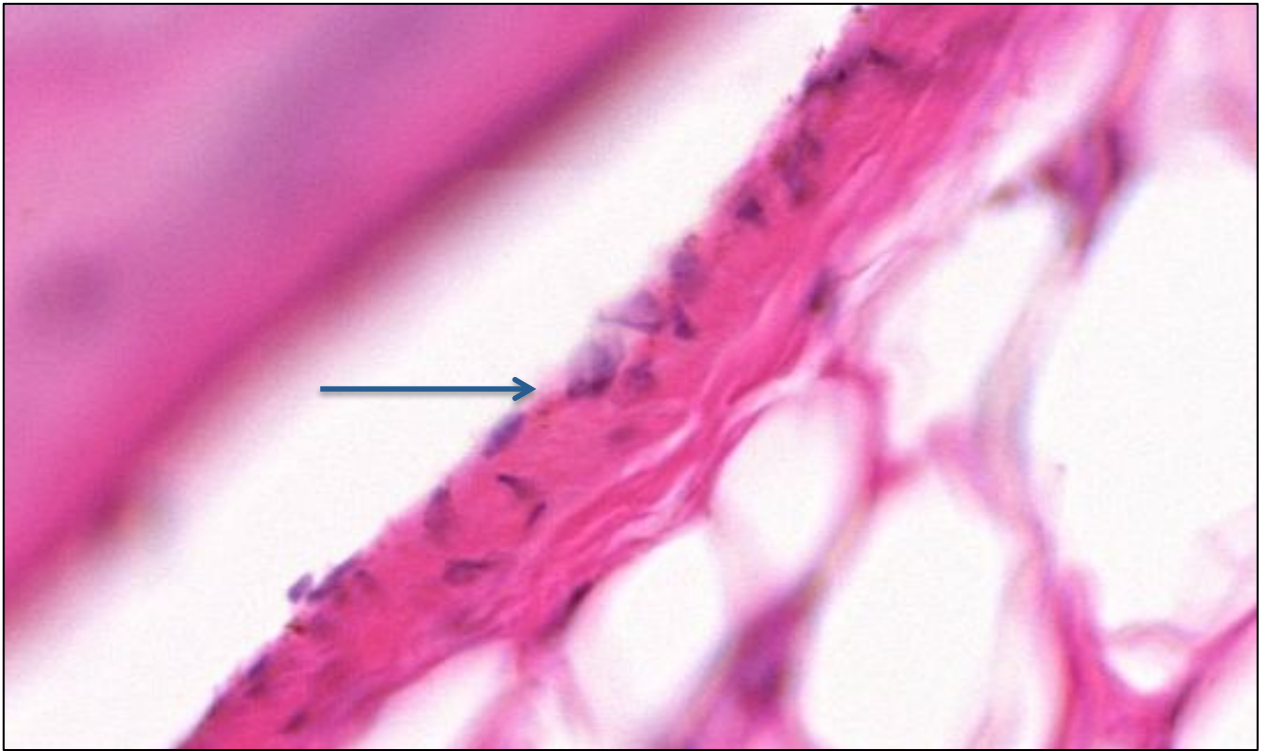


Figura 45: Coelho 4, Grupo 10. Rima periférica de osteoblastos (++) (40x).

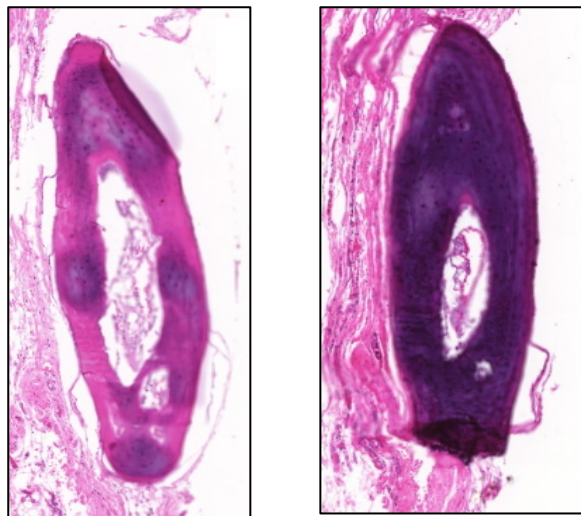


Figura 46: Coelho 44, Grupo 10. Formação óssea seriada, regular, com calcificação e vascularização na matriz (10x).

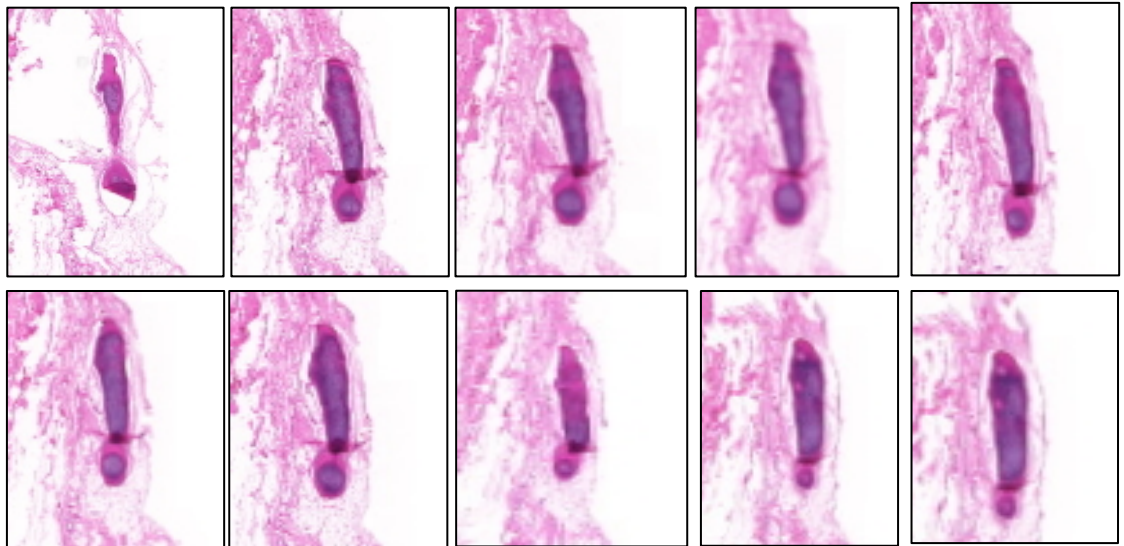


Figura 47: Coelho 55, Grupo 10 (5x). Imagens seriadas da formação óssea neoformada.

Tabela 21: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 10.

Grupo 10			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
4	2,29	0,09	112,90
41	1,96	0,16	58,99
45	0,50	0,09	4,15
46	9,36	0,15	1086,29
89	0,57	0,03	24,40
90	3,66	0,10	245,87
91	0,21	0,02	4,69

Nos Grupos 9 e 10, não houve diferença estatística na presença de formação óssea ( $p=0,2259$ ).

No Grupo 11, o retalho de gálea e periósteo vazio apresentou cinco animais (33,33%) com evidência de formação óssea, irregular, pouco organizada, de tamanho pequeno (Figura 48) (Tabela 22).

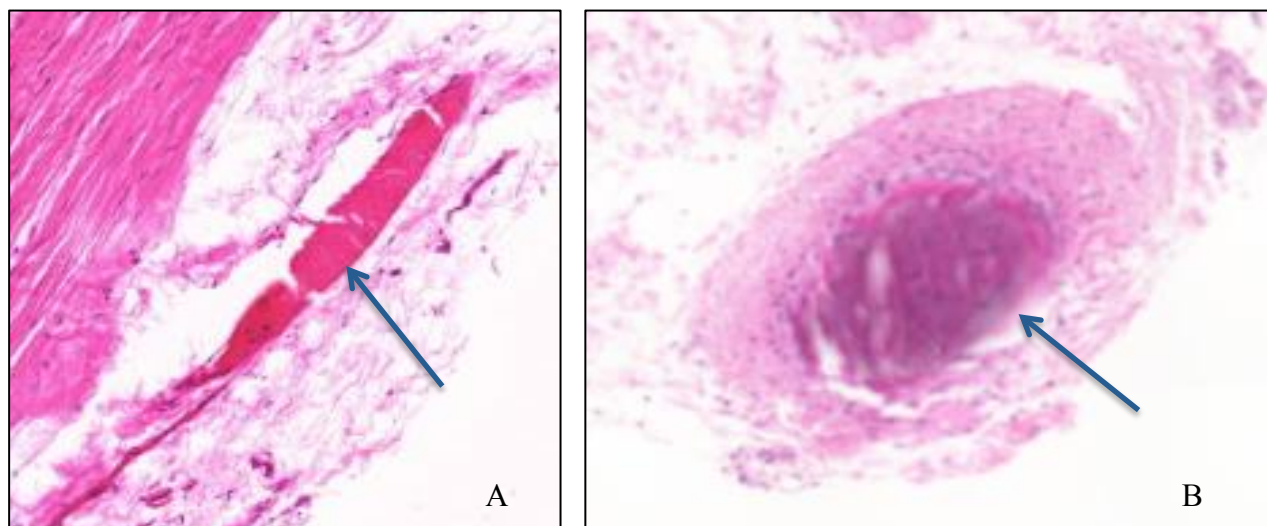


Figura 48: A – Coelho 37, Grupo 11. B – Coelho 81, Grupo 11. Imagens da formação óssea com tecido ósseo pequeno, irregular com poucos osteócitos e sem osteoblastos (20x).

Tabela 22: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 11.

Grupo 11			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
37	0,23	0,03	2,35
71	2,06	0,07	108,44
74	1,05	0,03	75,23
81	0,87	0,03	47,61
85	0,19	0,02	4,50

No Grupo 12, onde foi introduzido ácido hialurônico no retalho tubular, seis amostras apresentaram formação óssea (40%), todos de tamanho pequeno, menores que 1,5 mm<sup>2</sup> de área. Apresentam poucos osteócitos, sem vasos no interior da matriz (Figura 49) (Tabela 23).

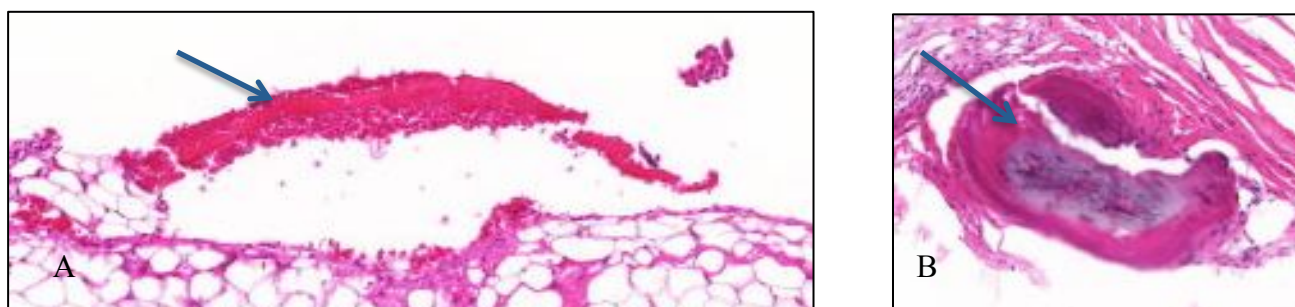


Figura 49: Formações ósseas do tecido ressecado. A – Coelho 56, Grupo 12 (20x). B – Coelho 74, Grupo 12 (20x).

Tabela 23: Medidas de área, perímetro e volume das formações ósseas do Grupo 12.

Grupo 12			
Número do animal	Área (mm <sup>2</sup> )	Perímetro (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )
56	0,28	0,04	2,95
74	0,63	0,03	26,78
81	0,11	0,02	1,01
85	0,73	0,09	16,09
86	0,74	0,08	25,74
87	1,43	0,05	85,86

Nos Grupos 11 e 12, também não houve diferença estatística da presença de formação óssea ( $p=0,2751$ ).

Não foram visibilizados osteoclastos em nenhum dos grupos.

Quanto às medidas realizadas nas formações ósseas encontradas, a maior média de área ocorreu no Grupo 2, e a menor média ocorreu no Grupo 5. A maior média do perímetro foi encontrado no Grupo 3 e a menor, no Grupo 11. O maior volume médio ocorreu no Grupo 2 e a menor média foi encontrada no Grupo 5, conforme especificado na Tabela 24 (Gráficos 3, 4 e 5).

Tabela 24: Média da área, perímetro e volume nos grupos que apresentaram formação óssea no estudo histológico. Em azul, as maiores medidas encontradas, em verde, as segundas maiores medidas e em vermelho, as menores medidas.

Grupos	Área média ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Volume médio ( $\mu\text{m}^3$ )
G2	2,81 (+/- 2,72)	0,09 (+/- 0,06)	252,04 (+/- 310,56)
G3	1,48 (+/- 2,18)	1,33 (+/- 2,76)	95,94 (+/- 192,29)
G4	1,49 (+/- 1,13)	0,09 (+/- 0,04)	83,54 (+/- 137,10)
G5	0,50 (+/- 0,28)	0,06 (+/- 0,04)	15,76 (+/- 15,96)
G6	2,12 (+/- 2,27)	0,09 (+/- 0,08)	140,56 (+/- 190,66)
G7	1,92 (+/- 1,27)	0,08 (+/- 0,04)	118,07 (+/- 132,80)
G8	2,29 (+/- 2,35)	0,10 (+/- 0,07)	165,76 (+/- 199,16)
G9	1,32 (+/- 0,95)	0,06 (+/- 0,02)	85,44 (+/- 88,19)
G10	2,66 (+/- 3,20)	0,10 (+/- 0,05)	219,62 (+/- 391,52)
G11	0,88 (+/- 0,76)	0,04 (+/- 0,02)	47,63 (+/- 45,74)
G12	0,66 (+/- 0,46)	0,06 (+/- 0,03)	26,41 (+/- 31,10)

Gráfico 3: Análise das medidas de área com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.

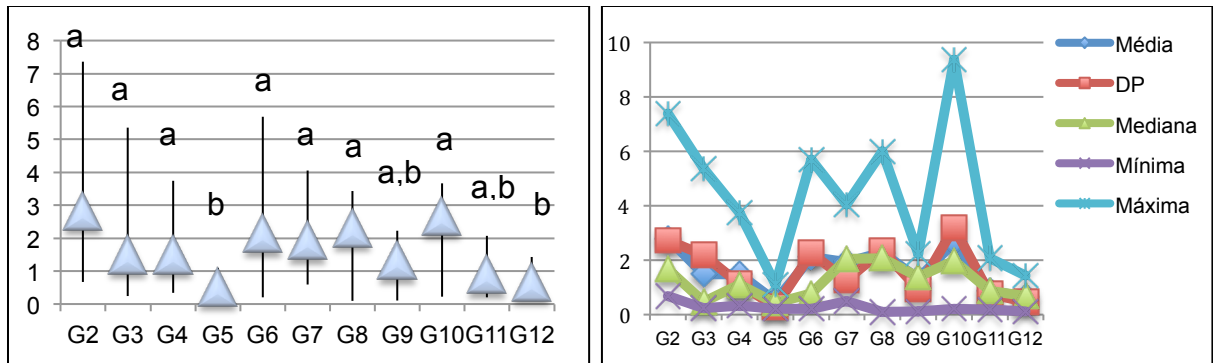


Gráfico 4: Análise das medidas de perímetro com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.

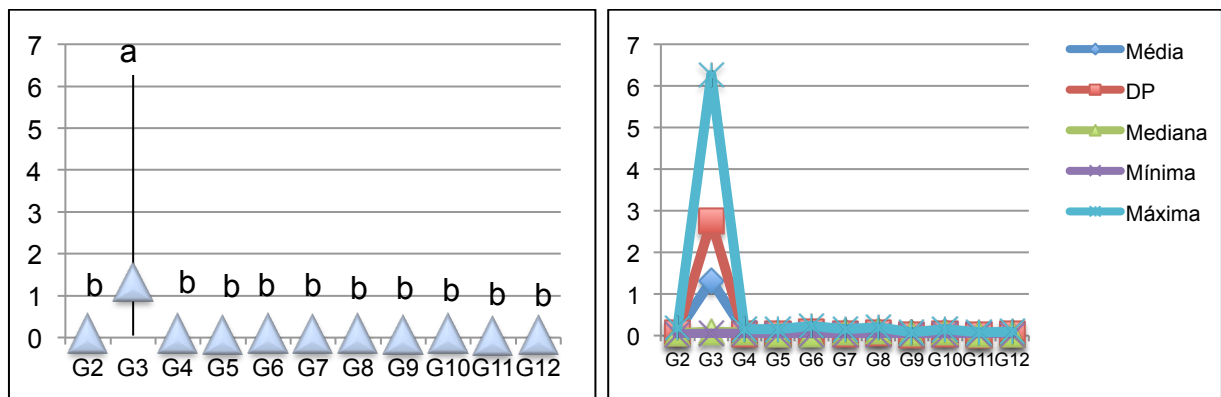
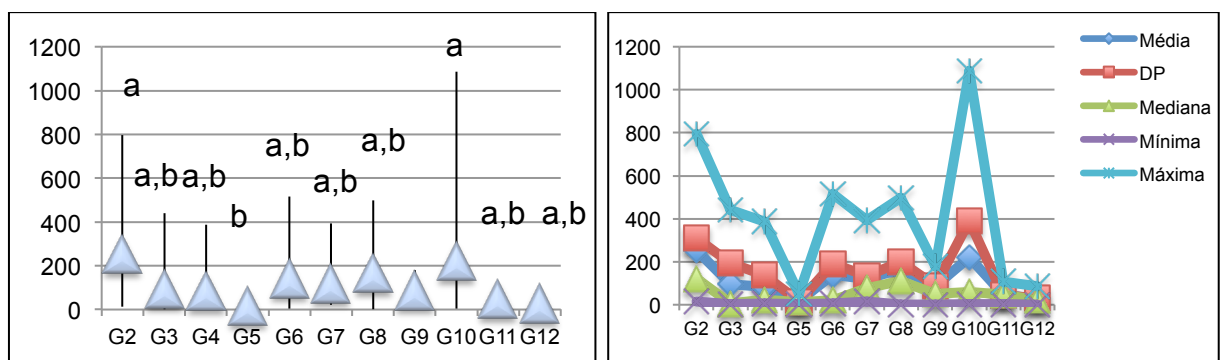


Gráfico 5: Análise das medidas de volume com evidência da média em azul, utilizado Teste do Qui-Quadrado. Valores de média, desvio padrão (DP), mediana, mínima e máxima.





# Discussão

## 5. Discussão:

A escolha pelo uso de coelhos foi devido ao tamanho adequado da calota craniana do animal para a manipulação proposta, além de proporcionar uma boa vascularização através dos vasos temporais, fundamentais para a confecção do retalho proposto. Além disso, já havia sido utilizado em outros estudos sobre reconstrução óssea e também em estudo prévio da mesma linha de pesquisa<sup>57, 64, 65</sup>.

Foram utilizados apenas animais machos para evitar alterações hormonais comuns em fêmeas<sup>66</sup>.

O número da amostra foi determinado por um estudo piloto prévio e embasado em estudos experimentais publicados que avaliaram a formação óssea e utilizaram entre 12 e 39 animais por estudo. Dentre eles, um estudo da mesma linha de pesquisa realizado pelo mesmo grupo de autores. Foi definido o grupo controle com 10 animais e os demais grupos com 15 animais, baseados em números amostrais de estudos experimentais da literatura e calculado para que fosse o menor número capaz de determinar resultados significantes<sup>26,27,57,67-70</sup>.

Todos os animais utilizados foram pesados para padronizar os tamanhos e idade deles. A gordura coletada para separação de células-tronco mesenquimais também foi pesada para manter um volume adiposo padrão do material coletado, apesar da separação do tecido em laboratório ter tido o volume também padronizado.

Apesar de diferenças de peso dos animais, esta variável não teve interferência no peso da gordura coletada.

### 5.1. Retalho de gálea e periósteo:

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo formado por células e uma matriz extracelular com capacidade de mineralização, que confere a este tecido a capacidade de sustentação. O osso é um tecido dinâmico que apresenta formação, crescimento, reabsorção, reparação e remodelação durante toda a vida. Apresentam as fases osteoblásticas e osteoclásticas<sup>52</sup>.

Para esta osteogênese ocorrer, é necessário ter vascularização adequada, assim, foi optado pelo uso de retalho composto de gáleo-periosteal, já utilizados em estudo prévio da mesma linha de pesquisa<sup>57</sup>.

Este tipo de retalho, com fáscia têmporo-parietal, é também utilizado em reconstruções faciais, pois promove uma cobertura de tecido mole mantendo a vascularização, sendo mais resistente a infecções e apresenta menor absorção óssea.

A escolha de utilizar o retalho de periósteo e calvária em coelho foi pelo importante pedículo vascular através dos vasos temporais e o enxerto de calota craniana foi substituído por pó de osso por proporcionar menor morbidade da área doadora. O retalho preenchido com pó de osso também favorece a mobilização e moldagem do retalho conforme a forma tridimensional desejada.

## 5.2. Plasma rico em plaquetas:

O sangue é composto por células vermelhas, células brancas, plaquetas e plasma. A concentração normal de plaquetas no sangue varia de 150.000/ $\mu$ L a 350.000/ $\mu$ L. O plasma é a porção líquida do sangue que contém os fatores de coagulação, proteínas e íons<sup>71</sup>.

O plasma rico em plaquetas é definido como um volume da fração do plasma de sangue autólogo que possui fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos e o Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF-  $\beta$ ), além de efeitos angiogênicos, anti-inflamatórios e anti-catabólicos. Estes fatores regulam a migração e proliferação celular, cicatrização de feridas e remodelamento da matriz extra celular através da angiogênese. O PRP contém uma concentração destes fatores, 3 a 5 vezes maior que o sangue original<sup>62,71</sup>.

O início do uso do plasma rico em plaquetas, em 1997, está relacionado ao estudo de colas teciduais e obtenção de fibrina autóloga, pois é considerada uma fonte autógena de fatores de crescimento. O concentrado de plaquetas decorrente da centrifugação do sangue venoso, adicionado a cálcio e trombina, forma um gel de plaquetas rico em fatores de crescimento como o PDGF, TGF-beta, EGF, VEGF e IGF, apresentando propriedades hemostáticas, adesivas e cicatrizantes<sup>62, 72</sup>.

O PRP está sendo estudado e utilizado no tratamento de lesões de tecidos moles, úlceras crônicas, tendinopatias, fasciítes, regeneração periodontal e regeneração óssea em enxertos e fraturas<sup>73</sup>.

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares anucleados, com aproximadamente 1-3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Apresentam a função primária de hemostasia e a secundária de angiogênese, imunidade inata e cicatrização de tecidos danificados. Sua estrutura é composta por citoesqueleto e filamentos de actina e miosina. No citosol encontram-se numerosas organelas incluindo grânulos alfa e densos, peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias. Os grânulos densos contêm o ADP, ATP, histamina, serotonina e cálcio. Já os grânulos  $\alpha$  contêm fator 4 plaquetário, PDGF, VEGF, EGF, TGF- $\beta$ , fibrinogênio, fibronectina, inibidor I do ativador de plasminogênio (PAI I), Fatores V, VIII, Fator von Willebrand<sup>74</sup>.

O PRP congelado foi analisado e dosado quanto a concentração dos fatores de crescimento presentes e apresentou fibrinogênio, Fator von Willebrand, PDGF, VEGF, FDF, RANTES, PAI, EGF e angiopoetina 2.

Estudos mostram a centrifugação do sangue em diferentes graus de força, variando de 200 a 800 g (gravidade) por 10 a 15 minutos e verificam que quanto maior a força de centrifugação maior a concentração plaquetária.

A força de centrifugação é um fator importante para a separação dos componentes sanguíneos e depende da velocidade de centrifugação e do raio da centrífuga, sendo medida em força de gravidade (g)<sup>62</sup>.

As centrifugações deste estudo utilizaram 900 e 950 gravidade de força, com durações de 10 e 15 minutos, valores próximos às descrições da literatura.

Após a primeira centrifugação do sangue formam-se três camadas, uma inferior que contém as hemácias, uma superior com o plasma e as plaquetas e uma intermediária, esbranquiçada, que é a zona de névoa ou *buffy coat*, que contém plaquetas maiores e células brancas do sangue<sup>62</sup>.

As duas camadas superiores são aspiradas, transferidas para outro tubo e novamente centrifugadas. Após a segunda centrifugação forma-se um plasma pobre em plaquetas e um botão eritrocítico-plaquetário no fundo do tubo<sup>62</sup>.

Para produzir o gel de plaquetas, estudos utilizam o plasma rico em plaquetas, acrescentam gliconato de cálcio a 10%, colocam em banho-maria a 37°C por 15 minutos e depois o material é submetido a outra centrifugação e adicionado a trombina autóloga em uma proporção 1:5 (trombina: PRP)<sup>62</sup>.

A padronização utilizada adicionou volume mínimo de gliconato de cálcio a 10% (1µL) para não interferir no processo de calcificação proposto no estudo, o intuito é utilizar os fatores de crescimento presentes no PRP para promover a formação óssea.

O sangue coletado dos coelhos foi centrifugado a 900 g (gravidade) por 15 min e separado em 3 camadas: plasma, células vermelhas e plaquetas.

Foram confeccionados pérolas de PRP que foram introduzidas no retalho de gálea e periósteo nos Grupos 5, 6, 9 e 10. A concentração de plaquetas preparadas e introduzidas nos retalhos foi padronizada, sendo a mesma para todos os animais, não interferindo no resultado.

O Plasma Rico em Plaquetas tem facilidade de obtenção, baixo custo, rapidez e segurança para o paciente, sem os riscos de doenças transmissíveis pelo sangue, por serem de origem autóloga.

### 5.3. Células-tronco mesenquimais adultas do tecido adiposo:

A lipoenxertia é uma técnica largamente utilizada na cirurgia plástica reparadora e estética, o enxerto de gordura é utilizado como preenchedor autólogo para aumento mamário, atrofia faciais, deformidades congênitas, seqüelas de traumas, radioterapia e pós ressecções tumorais extensas.

No entanto, as células-tronco mesenquimais derivadas da gordura foram identificadas por Zuck e col. em 2001 com um potencial regenerativo. Apresentam células-tronco mesenquimais com a possibilidade de diferenciação em outras linhagens celulares como adipócitos, miócitos, neurônios, osteócitos, condrócitos e células endoteliais<sup>75,76</sup>.

Comparativamente com outras fontes de células-tronco mesenquimais, no tecido adiposo, 1 a 10% das células nucleadas são consideradas células-tronco e apenas 0,0001 a 0,01% das células nucleadas da medula óssea são consideradas células-tronco<sup>77, 78</sup>.

As células-tronco derivadas da gordura foram primeiramente utilizadas no tratamento de defeitos pós traumáticos da calota craniana<sup>79</sup>.

Estas CTM adiposas são definidas pela presença de marcadores celulares específicos como CD44, CD73, CD90 e CD105 e ausência de CD11b, CD14, CD19, CD 31, CD34, CD45, CD79, e HLA-DR<sup>80-82</sup>.

O isolamento das células mesenquimais da gordura do coelho são identificadas com marcadores específicos de superfície (CD 90)<sup>37</sup>.

Para esta avaliação e possibilidade de afirmação da presença de células-tronco mesenquimais no presente estudo foram utilizados os marcadores celulares CD90, CD44 e anticorpos anti-CD45 e anti-CD 11b.

Estes marcadores demonstraram alta concentração de anticorpos anti-CD45, linfomononucleares e anti-CD11b, monócitos no início, antes da cultura celular, com pouca concentração de CD90 e CD44. No entanto, após a terceira passagem celular e avaliação final das CTM derivadas de tecido adiposo cultivadas, os valores inverteram, demonstrando a presença de CD90, CD44 e níveis baixos de CD45 e CD11b, comprovando a formação de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

Além disso, as células cultivadas demonstraram capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares. Formou-se tecido ósseo, tecido adiposo e tecido vascular.

#### 5.4. Ácido hialurônico:

O ácido hialurônico é de origem não animal, produzido a partir de fermentação bacteriana de *Streptococcus* e estabilizado por ligação de cadeias de glicosaminoglicanos de forma a ser imunologicamente inerte. O ácido hialurônico propriamente dito é degradado na derme tendo sua metabolização final no fígado, a medida que é injetado é também degradado, mais moléculas de água tendem a se ligar ao ácido hialurônico restante, levando a um processo chamado de degradação isovolêmica, ou seja, apesar do preenchedor estar sendo absorvido, o efeito cosmético permanece por um tempo maior. O efeito dura aproximadamente de 6 a 12 meses, dependendo do tamanho da molécula utilizada, da profundidade e do local da aplicação<sup>51,59</sup>.

Utilizado como preenchedor cutâneo na prática estética, é de fácil aquisição e custo não muito elevado, fatos estes que facilitam o uso nos procedimentos cirúrgicos propostos.

Devido a estas características, não influencia na produção celular, é inerte e apenas atrai moléculas de água, é utilizado como meio para o uso de células tronco mesenquimais pois possui consistência mais espessa, possibilitando a melhor manipulação e manutenção das células tronco dentro do retalho confeccionado, evitando a dispersão e perda do material no local operado.

Os resultados do Grupo 12, em que foi utilizado o ácido hialurônico dentro do retalho de gálea e periósteo, foram semelhantes ao grupo do retalho vazio dos Grupos 4 e 11 na avaliação semi-quantitativa e quantitativa, sem diferença estatística ( $p=2751$ ) ( $p=0,1521$ ), demonstrando que este material não influencia na formação óssea proposta, apenas contribui para a maior facilidade de manipulação das células tronco mesenquimais.

#### 5.5. Análise de imagem:

Estudos da literatura sobre formação óssea com uso de tecido ósseo morcelizado em retalho de fáschia e retalho de periósteo demonstraram imagem radiopaca em radiografias realizadas após 4 semanas, com maior evidência após 8 semanas no grupo do periósteo. Outros estudos analisaram a formação óssea através de radiografias após 9 semanas e 3 meses. Estudo prévio que avaliou a formação óssea em retalho de gálea e periósteo preenchido com pó de osso utilizou análise radiográfica após 30 e 60 dias<sup>46, 57, 83</sup>.

Optou-se por realizar as avaliações radiográficas pós operatórias nos tempos 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

As imagens foram analisadas por dois avaliadores da classe médica que encontraram imagens hiperdensas sugestivas de tecido ósseo neoformado, principalmente na incidência lateral.

Na incidência dorso-ventral, apenas um animal foi considerado positivo para a presença de imagem hiperdensa em região craniana aos 60 dias, pertencente ao Grupo 7, em que foi usada a CTM. A dificuldade de visibilização de neoformação

óssea nesta incidência ocorre devido a sobreposição de imagens de ossos craniofaciais do animal.

A incidência ântero-posterior foi utilizada para permitir a diferenciação do lado em que a imagem óssea é diagnosticada, pois os grupos apresentavam diferentes materiais e combinações de osteoindutores de acordo com o lado da calota craniana. No entanto, foi uma incidência com baixa positividade, sendo encontrado apenas um animal aos 30 dias, pertencente ao Grupo 5 e um animal aos 60 dias, pertencente ao Grupo 3. Ambos os animais considerados positivos foram coincidentes entre os dois examinadores.

Assim, a incidência com maior número de imagens hiperdensas foi a lateral. Foi possível notar espículas ósseas acima da calota craniana do animal, no entanto, esta incidência impossibilitava a precisão quanto ao lado exato da calota craniana que apresentava a formação óssea.

O maior número de resultados positivos ocorreram nos grupos 5, 6, 7 e 8, onde utilizou-se PRP e CTM individualizadas, com ou sem pó de osso. Foram seguidos pelos grupos 3, 4, 9 e 10 e os grupos 1, 2, 11 e 12 obtiveram o menor número de imagens positivas aos 30 dias de análise radiográfica. Aos 60 dias, os grupos 5, 6, 7 e 8 também apresentaram maior número de positividade, mas foram seguidos pelos grupos 1, 2, 3 e 4, sendo os grupos 9, 10, 11 e 12 aqueles que apresentaram o menor número de imagens ósseas.

A análise tomográfica propunha complementar e caracterizar mais detalhadamente as imagens ósseas neoformadas na calota craniana dos animais, no entanto, não adicionaram nenhum resultado positivo. Não foi possível visibilizar imagem característica de formação óssea onde os retalhos foram confeccionados. Apesar de utilizarmos cortes de 1 mm e ter sido utilizada a reconstrução tridimensional, acreditamos que as formações ósseas foram muito pequenas para serem evidenciadas ao exame tomográfico.

Pudemos notar depressões e falhas ósseas na calota craniana, demonstrando a manipulação realizada e possivelmente formada devido a raspagem local para coleta do pó de osso.

## 5.6. Formação óssea:

O Grupo 1 ou controle, que não foi manipulado, não apresentou formação óssea, não sendo comparado ao tecido ósseo formado pelos demais grupos.

O processo de formação óssea crânio-facial, intramembranosa, inicia-se a partir de células mesenquimais indiferenciadas que agrupam-se e, através de fatores extrínsecos, começam a formar uma matriz com vasos sanguíneos, fibroblastos e osteoblastos. Formam espículas de matriz óssea que se mineralizam e formam as trabéculas ósseas, considerado osso imaturo ou pré-osso. Fosfato de cálcio é depositado e então ocorre a organização celular. Após o aparecimento de osteoclastos, o tecido imaturo é absorvido e substituído por tecido ósseo maduro ou lamelar com camadas bem ordenadas em disposição paralela ou concêntrica<sup>52,53</sup>.

Os osteoblastos são células mesenquimatosas indiferenciadas e pluripotentes localizadas preferencialmente no perióstio e na medula óssea, responsáveis pela formação óssea<sup>52</sup>.

O Grupo 2, com retalho vazio e lado contralateral não manipulado, apresentou maior porcentagem de formação óssea e com maior número de osteócitos quando comparado aos Grupos 4 e 11 que foram feitos os retalhos vazios, mas houve manipulação no lado contralateral, desta forma, acreditamos que o processo inflamatório desencadeado pela maior manipulação cirúrgica pode comprometer a neoformação óssea.

Foram escolhidos o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e as células-tronco mesenquimais adultas provenientes da gordura autóloga como estimuladores do processo de formação óssea dentro do retalho de gálea e perióstio.

As células-tronco mesenquimais são capazes de diferenciarem-se em diversos tipos celulares dependendo dos fatores reguladores presentes no meio. Em áreas vascularizadas, as células com potencial osteogênico, como é o caso das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, formarão osteoblastos<sup>58</sup>.

Estas células estão também envolvidas na cicatrização de feridas, estimulam a angiogênese, reduzem a inflamação local, tem atividade antimicrobiana pois secretam proteínas antimicrobianas e fatores imuno moduladores<sup>54-56</sup>.

No início, o osso não tem um padrão organizado e progressivamente torna-se organizado e reúne-se em lamelas ou camadas. Ao redor dos vasos sanguíneos, formam-se lamelas concêntricas ou sistemas de Havers. Alguns osteoblastos permanecem na periferia do osso em desenvolvimento e continuam a depositar camadas. O osso entre as placas superficiais permanece esponjoso onde permanecem os osteoclastos, células responsáveis pela absorção óssea<sup>53</sup>.

Os pré-osteoblastos são células que encontram-se nas superfícies de formação óssea e tem reduzida capacidade de proliferação, mas gradativamente adquirem as características de osteoblastos. Estes então tornam-se maduros quando apresentam-se como células cúbicas, polarizadas<sup>52</sup>.

Os osteócitos ficam organizados e regularmente espaçados no matriz óssea<sup>52</sup>.

Os fatores de maturação e distribuição celular foram os que definiram os melhores resultados presentes nos Grupos 7, 8, 9 e 10.

Bertolai e col. (2015), demonstraram que o uso de PRP e CTM com tecido ósseo autólogo aumentaram a espessura óssea na região maxilar, suficiente para a colocação de implantes dentários<sup>14</sup>.

Os Grupos 5 e 6 demonstraram resultados positivos, mas ainda pouco maduros e com irregularidades. No entanto, histologicamente, o lado com a associação de PRP e osso (G6) apresentou melhores resultados quando comparados ao lado com PRP apenas (G5).

Nos Grupos 7, 8, 9 e 10, os resultados também apresentaram-se melhores quanto maior o número de fatores utilizados para o enriquecimento celular.

Os Grupos em que foram realizados o retalho vazio, apenas com perióstio, apresentaram semelhança com o Grupo 12 onde foi introduzido o ácido hialurônico, o que demonstra ser este material inerte, sem influência na formação óssea, apenas contribui para a manipulação das CTM.

O Grupo 5, onde foi utilizado apenas o PRP isoladamente, apresentou formação óssea menor e irregular. Considerado seu resultado inferior aos Grupos de PRP associado a osso (G6), CTM isolada (G7) e CTM associada a osso (G8), que

obtiveram resultados semelhantes.

O Grupo do PRP associado a CTM (G9) mostrou formação óssea mais organizada e regular, considerado seu resultado melhor do que os grupos citados anteriormente.

No entanto, os melhores resultados, com formação óssea regular, cilíndrica, boa vascularização e osteoblastos organizados foram apresentados pela associação de PRP, CTM e osso (G10).

Os osteoclastos, células gigantes multinucleadas, responsáveis pela remodelação e renovação do tecido ósseo<sup>52</sup> não foram identificadas no material analisado em nenhuma das lâminas estudadas.

Como nenhum grupo apresentou a presença de osteoclastos, um indicativo de maturidade celular óssea, o tempo de avaliação de 60 dias de pós operatório pode ser considerado insuficiente, sendo necessário aguardar um período mais longo para avaliação.

O número de células injetadas foi padronizada tanto no Grupo do PRP quanto no Grupo da CTM, portanto o número celular não foi considerado uma variável para definir o grau de diferenciação celular.

Os animais também não apresentaram diferenciações quanto ao peso e idade, fatos que também não foram considerados como relevantes nas diferenças de formação óssea.

As variáveis relevantes foram o perióstio, o pó de osso, o PRP e a CTM. Quanto maior o número de variáveis utilizadas, o resultado histológico foi mais organizado e com formações ósseas maiores.

Apesar de resultados promissores, as CTM e PRP ainda não são permitidos para utilização na prática clínica.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Nota técnica nº 064/2015), a utilização do PRP com indicações clínicas e finalidade terapêutica devem ser reconhecidas e autorizadas pelos respectivos Conselhos Profissionais<sup>84</sup>.

De acordo com o PARECER CFM nº 20/11: “o referido produto (PRP) ainda se

encontra em fase experimental. Nos últimos anos, a prática da medicina baseada em evidências vem se desenvolvendo; estudos plenos de sabedoria e imparcialidade vêm definindo o que é realmente bom, seguro e de aplicação aprovada. O PRP ainda não foi avaliado desta forma, não havendo evidências científicas de sua utilidade, tratando-se, portanto, de procedimento experimental”.<sup>85</sup>

Segundo a RESOLUÇÃO do CFM (Conselho Federal de Medicina) nº2.128/2015, Publicado no D.O.U. de 29 de out. de 2015, Seção I, p. 236:

“Art. 1º: Considerar a prática do uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como experimental no tratamento de doenças musculoesqueléticas e outras anunciadas;

Art. 2º: Restringir o uso do PRP à experimentação clínica, dentro dos protocolos do sistema CEP/CONEP, a ser conduzida em instituições devidamente habilitadas para tal fim e que atendam às normas do Ministério da Saúde para o manuseio e uso de sangue e hemoderivados no país.”

Desta forma, os estudos experimentais e clínicos têm grande importância para alcançar definições e protocolos para a utilização eficaz destes materiais que podem influenciar positivamente na prática médica.



**Conclusão**

## 6. Conclusões:

Neste estudo, com o modelo experimental utilizado, foi possível evidenciar a formação óssea dentro de um retalho gáleo-periotal vascularizado em calota craniana de coelhos.

Foi demonstrado que a formação óssea melhora com o uso de fatores de enriquecimento celular como pó de osso, plasma rico em plaquetas e células-tronco mesenquimais.

O plasma rico em plaquetas demonstrou capacidade de formação de tecido ósseo, mas histologicamente irregular, imaturo.

Quando associado ao pó de osso houve uma formação mais regular e organizada.

A célula-tronco mesenquimal também apresentou formação óssea, com características teciduais organizadas, próprias do tecido ósseo maduro.

Quando associada ao pó de osso e ao PRP, as características histológicas apresentaram-se com tecido organizado, regular, maduro com células bem formadas e organizadas.

Quanto maior a soma dos fatores e estímulos de crescimento celular inseridos no tubo de gálea e perióstio, melhor a qualidade do tecido ósseo formado, maior o tamanho, estrutura e diferenciação celular com presença de osteócitos, osteoblastos e vascularização na matriz óssea formada.



## Referências Bibliográficas

## 7. Referências Bibliográficas:

1. Baumeister S, Peek A, Friedman A, Levin LS, Marcus JR, Management of postneurosurgical bone flap loss caused by infection. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008, 122(6): 195-208.
2. Wang Z, Li Z, Dai T, Zong C, Liu Y, Liu B. Addition of adipose-derived stem cells to mesenchymal stem cell sheets improves bone formation at an ectopic site. *Int J of Mol Sci*. 2016, 17(70): 1-10.
3. Netscher, DT, Stal S, Shenaq S. Management of residual cranial vault deformities. *Clin Plast Surg*. 1992, 19: 301.
4. Chang DW, Satterfield WC, Son D, Neto N, Madewell JE, Raymond AK, Patrick CW, Miller MJ, Costelloe CM, Weber KL. Use of vascularized periosteum or bone to improve healing of segmental allografts after tumor resection: An ovine rib model. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009, 123(1): 71-78.
5. Parvathaneni U, Laramore GE, Liao JJ. Technical advances and pitfalls in head and neck radiotherapy. *J Oncol*. 2012, 2012: 597467.
6. Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg*. 2004, 100: 163.
7. Posnick JC. Treacher Collins syndrome: Evaluation and treatment. In *Craniofacial and Maxillofacial Surgery in Children and Young Adults*, 1st Ed. Philadelphia: Saunders, 2000.
8. Kim H, Lee JH, Suh H, Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Medical Journal*. 2003, 44(2): 187-97.
9. Mascarenhas MD, Silva MM, Malta DC, Moura LD, Goes PS, Moysés ST, Morais Neto OL. Epidemiological profile of emergency care for dental and oral injuries in Brazil, 2006-2007. *Cad Saude Publica*. 2012, 28:124-32.
10. Deshingkar SA, Barpande SR, Bhavthankar JD. Congenital hemifacial hyperplasia. *Contemp Clin Dent*. 2011, 2(3):261-4.
11. Shete P, Tupkari J, Benjamin T, Singh A. Treacher Collins syndrome. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011, 15(3):348-51.
12. Kasat V. Franceschetti syndrome. *Contemp Clin Dent*. 2011, 2(3):245–248.
13. Sanahuja VR, Molins EG, Gaarré CS, Esquerro JQ, Fructuoso GG, Clara JMC.

Presentation of two cases of Crouzon syndrome: allelic cranio-stenotic conditions of FGFR genes. *An Pediatr (Barc)*. 2012, 1-7.

14. Bertolai R, Catelani C, Aversa A, Rossi A, Giannini D, Bani D. Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2015, 12(2):183-7.

15. Jaquet Y, Higgins K, Enepekides D. The temporoparietal fascia flap: A versatile tool in head and neck reconstruction. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*. 2011, 19(4): 235-41.

16. Lai A, Cheney ML. Temporoparietal fascial flap in orbital reconstruction. *Arch Facial Plast Surg*. 2000, 2:196-201.

17. Goiato MC, Santos, DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Carvalho Dekon SF, Zavanelli AC, Most frequent tumors in maxillofacial area rehabilitated through surgical reconstruction and prostheses. *J Craniofac Surg*. 2010, 21(2):396-99.

18. Kumar AR, Bradley JP, Harshbarger R, Stevens F, Bell R, Moores L, Armonda R, Warfare-related craniectomy defect reconstruction: Early success using custom alloplast implants, *Plast Reconstr Surg*, 2011, 127(3):1279-87.

19. Saska S, Hochuli-Vieira E, Pereira Filho VA, Gabrielli MAC, Oliveira CF, Cancian DCJ, Implantes de polietileno poroso em calota de Coelho. Análise histológica comparativa. *Rev Cir Traumatol Boco-Maxilofac*. 2007, 7(3):49-58.

20. Elgali I, Turri A, Xia W, Norlindh B, Johansson A, Dahlin C, Thmsen P, Omar O. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. *Acta Biomaterialia*. 2015, 29(2016): 409-23.

21. Agrawal A, Garg LN. Split calvarial bone graft for the reconstruction of skull defects. *Journal of Surgical Technique and Case Report*. 2011, 3(1): 13-16.

22. Gayathri V, Harikrishnan V, Mohanan PV. Integration of Rabbit Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells to Hydroxyapatite Burr Hole Button Device for Bone Interface Regeneration. *International Journal of Biomaterials*. 2015, 2016:1-9.

23. Vaccari-Mazzetti MP, Oliveira IS, Miranda-Ferreira R, Fauaz G, Ribeiro CN, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, Eça LP. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2010, 25(1): 24-27.

24. Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Therapy*. 1998, 5: 1098-

1104.

25. Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: State of the art. *BioMed Research International*. 2013, 11.

26. Alam I, Asahina I, Seto I, Oda M, Enomoto S. Prefabricated vascularized bone flap: A tissue transformation technique for bone reconstruction. 2001, 108(4): 952-58.

27. Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: An experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1998, 101(3):577-81.

28. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991, 9:641-50.

29. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. 1999, 284 (5411): 143-47.

30. Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Therapy*. 1998, 5: 1098-1104.

31. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell*. 2012, 10(3): 259-72.

32. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, MacNeil S, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells International*. 2016, 1-9.

33. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, MacNeil S, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression. Of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells International*. 2015, 2016:1-9.

34. Pelizzo G, Avanzini MA, Cornaglia AI, Osti M, Romano P, Avolio L, Maccario R, Dominici M, De Silvestri A, Andreatta E, Costanzo F, Mantalle M, Ingo D, Piccinno S,

- Calcaterra V. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: Pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *J Transl Med.* 2015, 13(219): 1-14.
35. Longo UG, Petrillo S, Franceschetti E, Berton A, Maffulli N, Denaro V. Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells International.* 2012, 1-9.
36. Banyard DA, Salibian AA, Widgerow AD, Evans GRD. Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery. *J Cell Mol Med.* 2015, 19(1): 21-30.
37. Gayathri V, Harikrishnan V, Mohanan PV. Integration of Rabbit Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells to Hydroxyapatite Burr Hole Button Device for Bone Interface Regeneration. *International Journal of Biomaterials.* 2015, 2016:1-9.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001, 7(2): 211–28.
39. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 2009, 24:274-282.
40. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: Biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 2014, 93(2): 109-16.
41. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003, 130:4123-33.
42. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res.* 2005, 23:1300-7.
43. Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LAPA. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. *Journal of Applied Oral Science.* 2007, 15(5): 442-7.
44. Sampath TK, Maliakal J, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RHL, Corbett C, Özkaynak E, Oppermann H, Rueger DC. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 1992, 267(28):20352-62.
45. Yeh L-CC, Tsai AD, Zavala MC, Lee JC. Cartilage-derived morphogenetic proteins

enhance the osteogenic protein-1-induced osteoblastic cell differentiation of C2C12 cells. *J Cell Physiology*. 2004, 201:401-8.

46. Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J*. 2004, 15(3): 175-80.

47. Cury VF, Guimarães MM. Fator de crescimento derivado de plaquetas na implantodontia. Novas perspectivas de tratamento para reconstrução óssea. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2012, 53:60-6.

48. Silva DCB, Quinello C, Pires DA, Pinto JR, Mattar AC, Krebs VLJ, Ceccon MEJR. Uso de fatores de crescimento epidérmico e estimulador de colônias de granulócitos na prevenção e tratamento da enterocolite necrosante no recém-nascido. *Rev Paul Pediatr*. 2008, 26(2):170-5.

49. Valiatti FB, Crispin D, Benfica C, Valiatti BB, Kramer CK, Canani LH. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011, 55(2): 106-13.

50. Medeiros AC, Mota HJ, Neto TA, Dantas Filho AM, Macedo LMB, Melo NMC. Efeitos do fator de crescimento de fibroblasto básico (FCF $\beta$ ) na cicatrização de anastomoses do esôfago. *Rev Col Bras Cir*. 2004, 31(1):21-6.

51. [plastica.fm.usp.br/estetica/capitulo-7.html](http://plastica.fm.usp.br/estetica/capitulo-7.html)

52. Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio aos alunos de mestrado integrado em medicina – disciplina de ortopedia. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2012, 1-51.

53. Moore KL. O Sistema Esquelético. In: *Embriologia Clínica*. 1990, 262-73.

54. Tartarini D, Mele E. Adult stem cell therapies for wound healing: Biomaterials and computational models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2016, 203(3): 2-7.

55. Isakson M, Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: current evidence and future potential. *Stem Cells Int*. 2015, 2015: 1-12.

56. Zahorec P, Koller J, Danisovic L, Bohac M. Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. *Cell Tissue Bank*. 2015, 16:19–26.

57. Brock RS, Viterbo F, Capel G, Domingues MA, Paschoalinotte EE, Labbé D. Galea and periosteum flap filled with bone fragments in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2013, 28(3): 195-201.
58. Oliveira HP. Protocolos anestésicos. <https://www.ufmg.br/bioetica/cetea>. 19 July, 2012, 21:52.
59. [www.exitusmedical.com.br](http://www.exitusmedical.com.br)
60. <https://medvet1317.files.wordpress.com/2015/04/entenda-o-seu-hemograma.pdf>
61. Freitas FLC. Avaliação fisiopatológica de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Eimeria stiedae* (Apicomplexa: Eimeriidae). Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. 2009.
62. Vendramin FS, Franco D, Franco TR. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plast.* 2009, 24(2): 212-8.
63. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas histológicas. In: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde. 2:89-188. <http://www.epsjv.fiocruz.br/publicacao/livro/conceitos-e-metodos-para-formacao-de-profissionais-em-laboratorios-de-saude-volum-2>.
64. Hassanein AH, Arany PS, Couto RA, Clune JE, Glowacki J, Rogers GF, Mulliken JB, Greene AK. Cranial particulate bone graft ossifies calvarial defects by osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2012, 129(5): 796e-802e.
65. Parro F, Viterbo F, Viterbo BG, Ueda A, Pinca F, Zanini S. Histological and radioisotopical analysis of the skull graft: An experimental study in rabbits. *J Craniofac Surg.* 1992, 3(4): 203-6.
66. Ptaszynska M, Hospools L. Reprodução de coelhos. *Compêndio de reprodução animal*, 311-25. [www.abspecplan.com.br/Compendio\\_Reproducao.pdf](http://www.abspecplan.com.br/Compendio_Reproducao.pdf).
67. Brey EM, Cheng MH, Allori A, Satterfield W, Chang DW, Patrick Jr CW, Miller MJ. Comparison of guided bone formation from periosteum and muscle fascia. *Plast Reconstr Surg.* 2007, 119(4): 1216-22.
68. Chang SH, Tung EY, Wang YJ, Tsao YP, Ni TS, Liu HK. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hidroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites. *Plast Reconstr Surg.* 2012, 125(5): 1393-1402.

69. Vögelin E, Jones NF, Lieberman JR, Baker JM, Tsingotjidou AS, Brekke JH. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg*. 2002, 109(1): 1443-50.
70. Aspoas AR, Wilson GR, McLean NR, Mendelow AD, Crawford PJ. Microvascular reconstruction of complex craniofacial defects. *Ann R Coll Surg Engl*. 1997, 79:278-83.
71. Yun S, Ku SK, Kwon YS. Adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma synergistically ameliorate the surgical-induced osteoarthritis in Beagle dogs. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2016, 11(9): 1-12.
72. Almeida ARH, Menezes JA, Araújo GKM, Mafra AVC. Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. *Rev Bras Cir Plást*. 2008, 23(2): 82-8.
73. Knop E, Paula LE, Fuller R. Plasma rico em plaquetas. *Rev Bras Reumatol*. 2016, 56(2):152-64.
74. Vanni, ISR, Deffunne E. Obtenção, indicadores de qualidade e propriedades dos hormônios derivados de plaquetas humanas pela técnica de lisado plaquetario. Tese de mestrado, UNESP, Botucatu. 2016, 1-75.
75. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, Manini I, Bergamin N, Toffoletto B, Beltrami CA, Beltrami AP, Cesselli D, Parodi PC. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015, 6(2):1-15.
76. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: Current clinical applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012, 129(6): 1277-90.
77. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugart DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso Z, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2002, 13(12): 4279–95.
78. Pak J, Lee JH, Kartolo WA, Lee SH. Cartilage regeneration in human with adipose tissue-derived stem cells: Current status in clinical implications. *BioMed Research International*. 2016: 1-12.

79. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004, 32:370-3.
80. Tocco I, Widgerow AD, Lalezari S, Banyard D, Shaterian A, Evans GRD. Lipotransfer. The potential from bench to bedside. *Annals of Plastic Surgery.* 2014. 72(5):599-609.
81. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006, 8(4):315-7.
82. Cheng KH, Kuo TL, Kuo KK, Hsiao CC. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Medicine, Biomarkers and Health Sciences.* 2011, 3: 53-62.
83. Hamajima S, Hayashi T, Sato Y, Sasaki K, Kawai T. Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. *Dental Materials Journal.* 2011, 30(5): 707-16.
84. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – [sangue.tecidos@anvisa.gov.br](mailto:sangue.tecidos@anvisa.gov.br)
85. [http://www.portalmedico.org.br/pareceres/CFM/2011/20\\_2011.htm](http://www.portalmedico.org.br/pareceres/CFM/2011/20_2011.htm)



**Artigo**

OSSEOUS FLAP OF GALEA AND PERIOSTEUM FILLED WITH  
MESENCHYMAL STEM CELLS, PLATELET RICH PLASMA, BONE DUST AND  
HYALURONIC ACID. STUDY IN RABBITS.

Ryane Schmidt Brock <sup>I</sup>, Fausto Viterbo <sup>II</sup>, Elenice Deffune <sup>III</sup>, Maria Aparecida Custodio Domingues <sup>IV</sup>, Maria Jaqueline Mamprim <sup>V</sup>, Eloisa Elena Paschoalinotte <sup>VI</sup>.

<sup>I</sup> Fellow Doctoral degree, Postgraduate Program in General Surgery Basis, Medical School of Botucatu, UNESP, São Paulo-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, acquisition of data, manuscript writing.

<sup>II</sup> PhD, Associate Professor of Plastic and Reconstructive Surgery Division, Department of Surgery, Botucatu School of Medicine, UNESP, São Paulo-SP, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study, interpretation of data, critical revision.

<sup>III</sup> Associate Professor of Hemotherapy Department, Botucatu School of Medicine, UNESP, São Paulo-SP, Brazil. Responsible for Botucatu Hemocenter and Cellular Engineering Laboratory. Stem cell process and cellular engineering.

<sup>IV</sup> Associate Professor and Head of Pathology Department, Botucatu School of Medicine, UNESP, São Paulo-SP, Brazil. Histological analysis.

<sup>V</sup> Associate Professor of Image and Diagnosis Department of Botucatu School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, São Paulo – SP, Brazil. Image analysis.

<sup>VI</sup> Statistical analyst, Member of the Research Support Group, Botucatu School of Medicine, UNESP, Sao Paulo-SP, Brazil. Statistical analysis.

## Abstract

**Background:** Craniofacial deformities caused by traumas, tumor resections or congenital malformation are frequent in medical practice, and their treatment with reconstructive surgeries are common, especially in plastic surgery, which aim to provide the patients with better quality of life and functional improvement of speech, breathing, chewing and swallowing.

**Objective:** This study evaluated a vascularized galeal and periosteum flap in rabbits, which could possibly substitute the bone graft in reconstructive surgery, especially for facial defects.

**Methods:** This experimental study involved rabbits, divided into twelve groups, submitted to a surgical procedure to construct the cranial flap of galea and periosteum filled with bone fragments, platelet rich plasma, mesenchymal stem cells and hyaluronic acid.

It was evaluated using image and histological analysis.

**Results:** The use of several enrichment materials of osseous cellular stimulation improved the quality and bone tissue organization. The more enrichment factor used, the better the tissue quality result was.

**Keywords:** bone, calvaria, craniofacial malformation, calvaria, flap, reconstruction, face, graft, mesenchymal stem cell, platelet rich plasma, hyaluronic acid, rabbit, osseous embryogenesis.

## INTRODUCTION

The craniofacial deformities caused by tumor resection, congenital malformation or trauma need reconstruction to recover the functional aspects of these lesions, like speech, breath, swallow and also the aesthetic aspect of these patients<sup>1,2</sup>.

There are many reconstructive techniques used in surgical treatment like autologous bone graft, local flaps, free flaps with microsurgical technique, alloplastic materials, bone substitutes and tissue engineering<sup>3-9</sup>.

Bone graft is the most used procedure. It is used to give volume and hardness, besides that, it is autologous and has no rejection. But it has variable absorption rate at the post operative that may interferes at the final result<sup>8,10-14</sup>.

Local flaps are used in minor defects and must have viable tissue around, they can be dermal or dermal-cutaneous flap.

The temporoparietal fascia flap has demonstrated its adaptability to various reconstructive defects. It is a thin, pliable and resistant coverage to cartilage or osseous tissue and has an important blood supply by the superficial temporal vessels. It has a vascular pedicle and its length allows the flap to reach the ipsilateral defects of the orbitomaxillary region, oral cavity and mandible<sup>15</sup>.

Free flaps are used in difficult reconstructions. They provide reliable, well-vascularized soft tissue and less tissue absorption. However, its complications like arterial or venous thrombosis can lead to a total flap necrosis. Besides, it demands a proper medical team trained on microsurgery technique and special surgical tools<sup>13-15</sup>.

Alloplastic materials can also be used in reconstructive procedures. They are materials of titanium, polymers, porous ceramics, hydroxyapatite, collagen sponges or hydrogels. They are easy to be used but there are risks like infection and extrusion. They do not fully osseointegrate, can become unstable with cranial growth and leads to inflammatory response as a foreign body<sup>16-19</sup>.

The periosteum has a very important influence in osseous healing, especially at endochondral ossification. Periosteum cells leads to chondrogenesis, osteogenesis and angiogenesis<sup>20-22</sup>.

Recent advances in tissue-engineering techniques have enabled new procedures to be developed for bone regeneration and these procedures have the potential to improve on the present clinical strategies.

Platelet rich plasma is a serum with more than  $1,1 \times 10^6$  platelets/ $\mu\text{L}$ , considered a natural source of growth factors like epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and endothelial growth factor (VEGF), that contributes to collagen production and cell differentiation<sup>23-26</sup>.

Mesenchymal stem cells were differentiated into connective and mesenchymal tissue by Caplan<sup>27</sup> and Pittenger *et al*<sup>28</sup>. The adult mesenchymal cells derived from bone marrow, subcutaneous tissue, muscle, dental pulp, synovia and umbilical cord are potential donor for cellular therapy. The mesenchymal stem cell is a natural, multipotent cell and differentiates into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and myocytes<sup>15</sup>.

However, the tissue-engineering techniques demand a specific laboratory, materials and prepared professional team.

It was imagined a galea and periosteum flap with a vascular pedicle and filled with bone fragments, platelet rich plasma, mesenchymal stem cell and hyaluronic acid to evaluate bone structure formation, which could be used at osseous facial deformities reconstruction.

## METHODS

The experimental study was performed at the UNIPLEX Laboratory of Botucatu Medical School, UNESP and at the Cellular Engineering of Botucatu Hemocenter, UNESP.

From April 2014 to September 2015, ninety-eight male, Norfolk rabbits of 70 days of life with mean weight of 2616,84g (+/- 400,27g), were divided into twelve groups.

Group 1: with ten animals, was not manipulated.

Group 2: with ten animals, had a galea and periosteum cylinder flap done at the calvaria and fixed at the frontal residual periosteum.

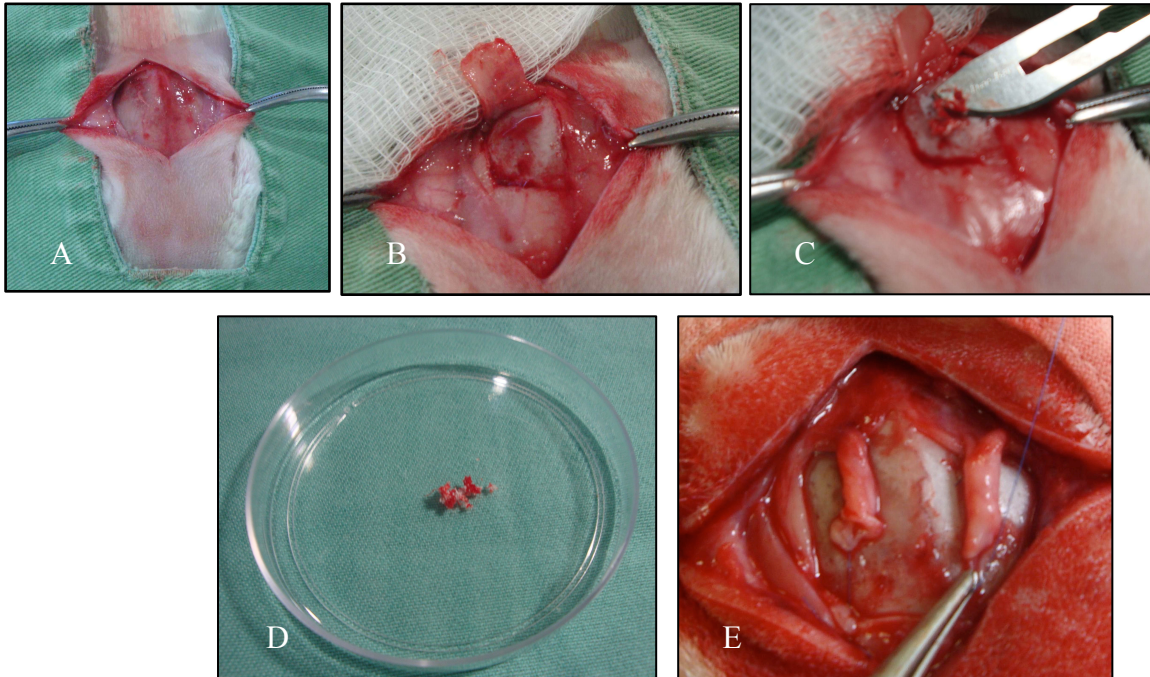


Figure 1: A – Surgical procedure, median incision at the rabbit cranium. B – Right flap elevated. C – Bone fragments harvested with an n° 23 surgical blade. D – Bone dust used to fill the flap. E – Image of both cylinder flaps produced and fixed at frontal residual periosteum.

Group 3: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap done and filled with bone dust harvested from the rabbit calvaria.

Group 4: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap done and maintained empty.

Group 5: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap done and filled with platelet rich plasma (PRP).

Group 6: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap filled with bone dust and platelet rich plasma.

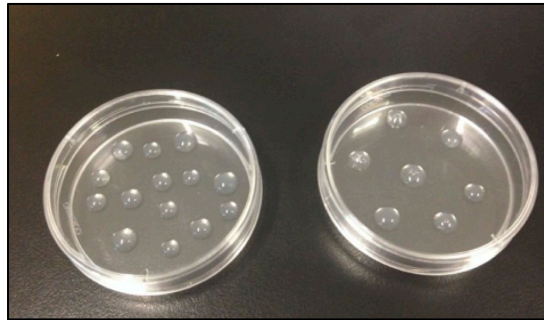


Figure 2: Platelet rich plasma pellets produced to fill the galea and periosteum flaps.

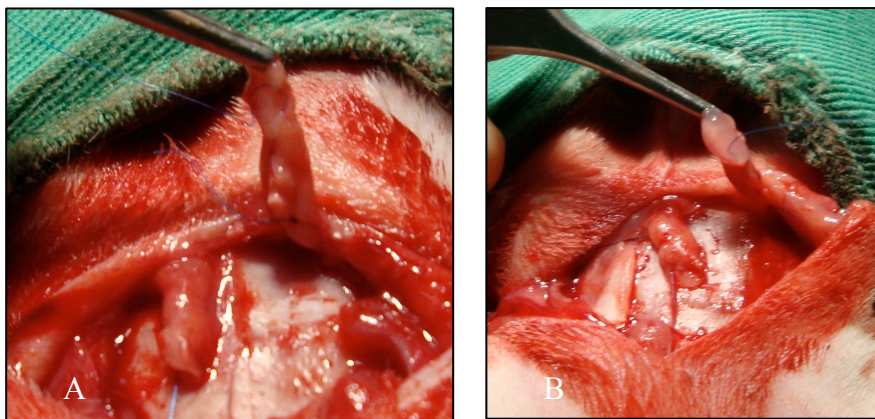


Figure 3: A – bilateral cylinder flaps. B – Inclusion of platelet rich plasma pellet inside left cylinder flap.

Group 7: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap done and filled with mesenchymal stem cell and hyaluronic acid.

Group 8: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap filled with bone dust, mesenchymal stem cell and hyaluronic acid.

Group 9: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap filled with mesenchymal stem cell and platelet rich plasma.

Group 10: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap filled with bone dust, mesenchymal stem cell and platelet rich plasma.

Group 11: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder flap done

and maintained empty.

Group 12: with fifteen animals, had a galea and periosteum cylinder filled with 0,1 ml of hyaluronic acid (14mg/ml).

The bone dust was harvested from the cortical calvarial bone with an n° 23 surgical blade and measured on a high precision balance to have similar bone mass used in the groups. The mean mass was 9,79 mg. All animals had venous anesthesia with Ketamina 10% - 10mg/kg (Dopalen<sup>®</sup>) and Xilazina 2% - 3mg/kg (Anasedan<sup>®</sup>).

The mesenchymal stem cells were produced by autologous rabbit dorsum fat. The mean mass of the fat collected from the animals of groups 7 and 8 was 3,23g and from groups 9 and 10 was 2,76g. These mass had no statistical difference between the groups.

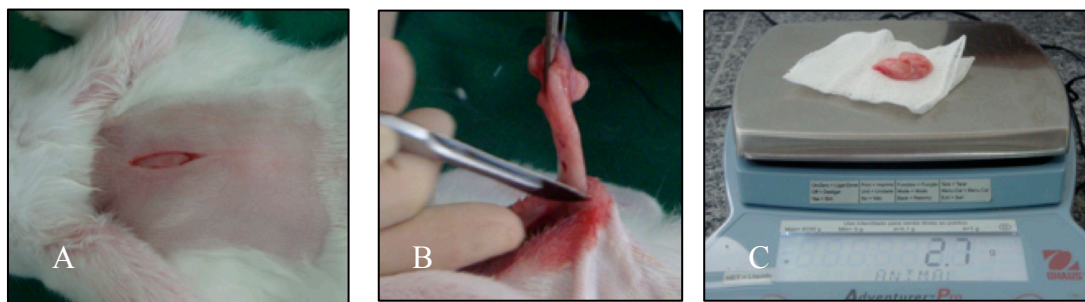


Figure 4: A – dorsal incision to collect fat tissue, B – fat tissue surgical excision, C – the fat collected is weighted and sent to laboratory.

The stem cell was associated with hyaluronic acid at Groups 7 and 8 to allow it to be manipulated and to be included into the galea and periosteum flap. At Groups 9 and 10, the mesenchymal stem cell was associated to platelet rich plasma.

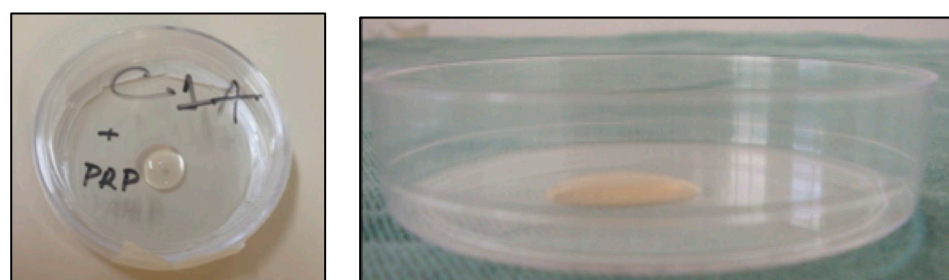


Figure 5: Pellet of mesenchymal stem cell and platelet rich plasma prepared

and identified to be used to fill the galea and periosteum flap at Groups 9 and 10.

The platelet rich plasma was produced by blood collected from five healthy rabbits previously submitted to anaesthesia, totally 25,3 ml of blood and 13,2 ml of final plasma volume. It was centrifugated in 900 g (gravity) during 15 min to separate red blood cells, platelet poor plasma and platelet rich plasma.

The animals were submitted to radiographic exams after 30 and 60 days post operative. It was used three different positions: dorsoventral, lateral and anteroposterior and were evaluated by two different examiners. The radiographies were compared to a normal one, of an animal without any intervention, and evaluated the presence of any radiopaque image at the calvaria.

At 60 days post operative, all animals were submitted to tomography scan in coronal and 3D images. After this period, the animals were submitted to surgical procedure to evaluate the flap. All flaps were bleeding, demonstrating good vascularization. After that, the animals were killed with venous anesthesia of Ketamina 10% - 80mg/kg (Dopalen<sup>®</sup>) e Xilazina 2% - 30mg/kg (Anasedan<sup>®</sup>).

The flap was resected and sent to histological analysis, stained with Hematoxylin-eosin and Masson trichrome. The analysis was done with Leica DMLS microscope. A cellular quantitative analysis was done with the measurement of area, volume and perimeter. A semi-quantitative analysis was done by two examiners, who evaluated the osteocytes, osteoblasts, vascularization, calcification and cellular organization in + to +++.

The statistical analysis was descriptive and graphical. For the variable with symmetric distribution was used Tukey-Kramer test, used to animal and fat weight analysis. Corcondance test and Kappa were used to the radiographic results and chi-square test was used to histological measurements and analysis. It was considered  $p < 0.05$ . The analysis was done in S.A.S 9.2 software for Windows.

## RESULTS

The mean mass of the animals were 2616,84 g (+/- 400,27 g). Fifteen animals died during the research from infection or during the anaesthesia. For this reason,

Groups 7, 8, 9 and 10 ended with 14 animals each.

The bone dust mass was from 8,8 mg to 10,9 (mean 9,79 mg +/- 0,67).

The mean mass of the fat tissue collected from Groups 7 and 8 was 3,23 g (+/- 1,97) and from Groups 9 and 10 was 2,76g (+/- 2,70). There was no statistical difference between them ( $p < 0,0001$ ).

The platelet rich plasma had 235.000 platelets and it has growth factors tested with luminex kit.

Table 1: Growth factors analysis in the platelet rich plasma.

Fibrinogen mg%	FvW ng/ml	PDGF- AAng/ml	VEGF- AAng/ml	FGF-1 ng/ml	FGF-2 ng/ml	RANTES ng/ml	PAI 1ng/ml	EGF Ng/ml	Angp-2 Ng/ml
187	83,34	0,51	0,335	2,6	37,94	2871	984	25,6	310

The mesenchymal stem cells produced by adult adipose tissue presented similar cellular number in all groups,  $1,0 \times 10^6$  cells, to avoid any kind of influence to the results of bone formation. They were also characterized by the differentiation in three cellular lineage: adipose, osseous and vascular tissue.

The stem cell was submitted to flow cytometry and evaluated cell markers: CD45, CD11b, CD90 and CD44.

Table 2: Mean value comparison of CD markers: CD 45, CD11b, CD90 and CD44, before plating and after the third passage.

Markers	CD45	CD11b	CD90	CD44
Befor plating	63,15 (+/-18,99)	62,69 (+/-13,71)	1,63 (+/-1,07)	1,56 (+/-0,92)
After third passage	0,91 (+/-0,78)	0,49 (+/-0,42)	97,88 (+/-2,00)	98,63 (+/-1,81)

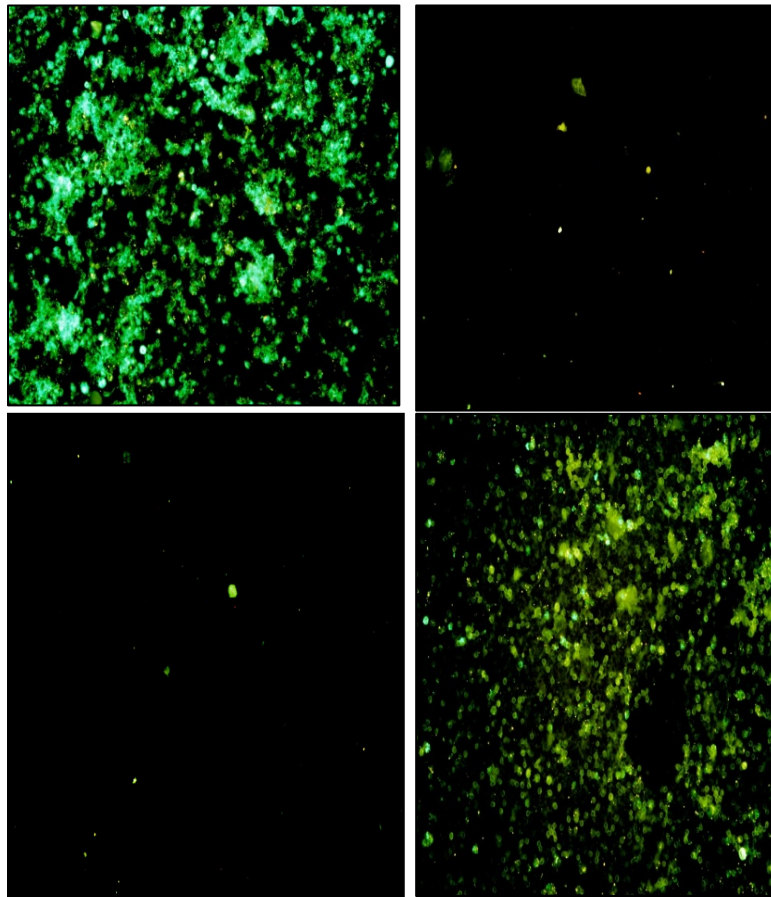


Figure 6: Classical immunofluorescence test with CD45 and CD90 markers before plating and after third passage. A – CD45 before plating, B – CD45 after third passage, C – CD90 before plating, D – CD 90 after third passage.

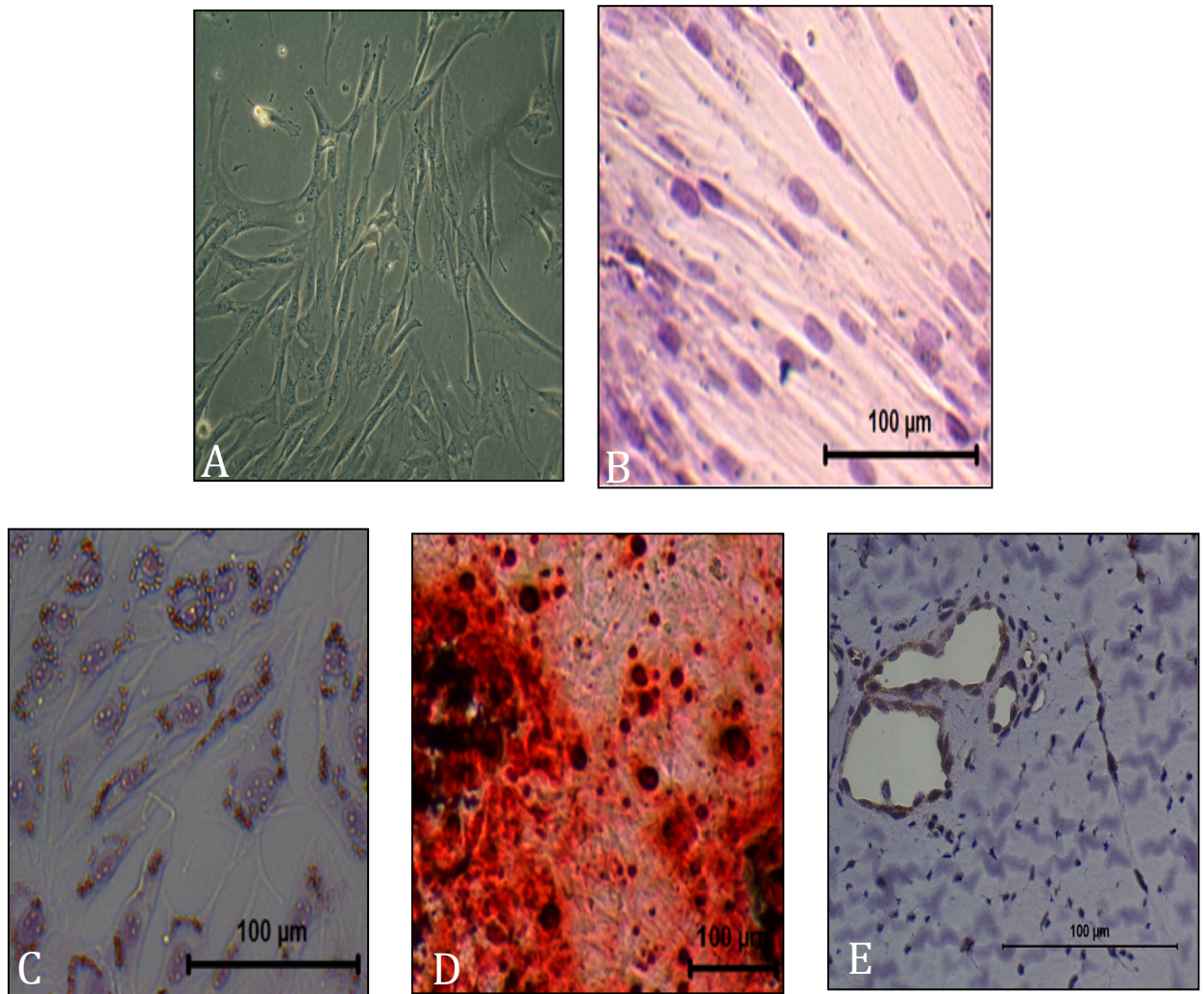


Figure 7: Culture photomicrography of stem cell differentiation. A – Plastic adherence test, fibroblastos cells (20x). B – Negative control without cellular differentiation (HE) (20x). C – Adipose differentiation stained with Oil Red. D - Osseous differentiation stained with Alizarin Red. E – Vascular differentiation stained with Hematoxylin-eosin.

At 30 days post operative, 34 and 37 animals had a hyperdense image at the lateral radiography to examiner 1 and 2 respectively, considered as positive image. The major number of positive image occurred in Groups 5 and 6. At the dorsoventral view, only one animal from Group 5 demonstrated a hyperdense image.

At the second analysis time, after 60 days, examiners 1 and 2 identified a

hyperdense image at the right side of calvaria at one animal from group 7 in dorsoventral view. In anteroposterior images, one animal from Group 3 was considered positive by both examiners. However, it was at the lateral view that there was the major number of positivity. Both examiners found 41 positive images, mostly at Group 5 and 6 (10 and 12 respectively).



Figure 8: Lateral radiographic view with a hiperdense image over the rabbit calvaria that was considered as a positive image to bone formation.

At the tomography, it had no evidence of osseous neoformation. The image at calvaria was the normal rabbit cranial structure.

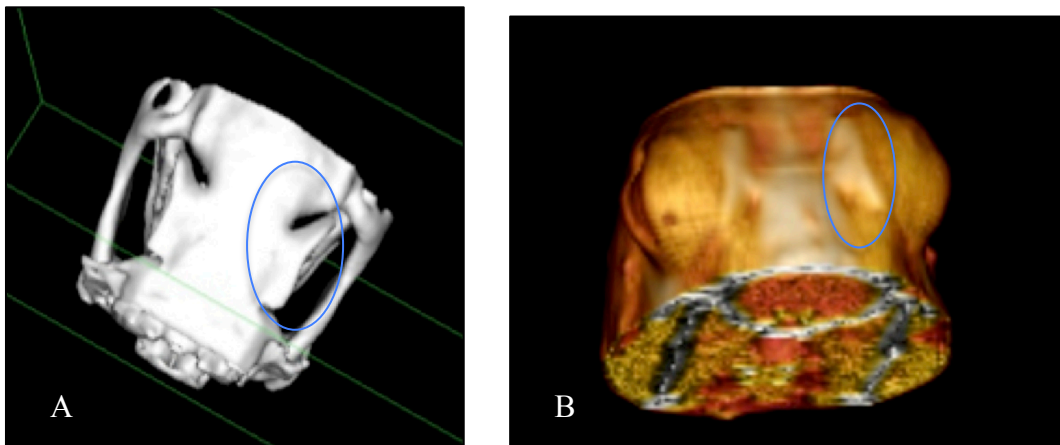


Figure 9: A – tomographic 3D osseous image to identify the normal osseous formation of the animal cranium, B – tomographic 3D image with evidence of the normal formation and no evidence of new bone formation.

The histological analysis demonstrated no bone formation at Group 1.

Group 2 had 60% of bone formation inside the flap, with irregular format and random osteocytes.

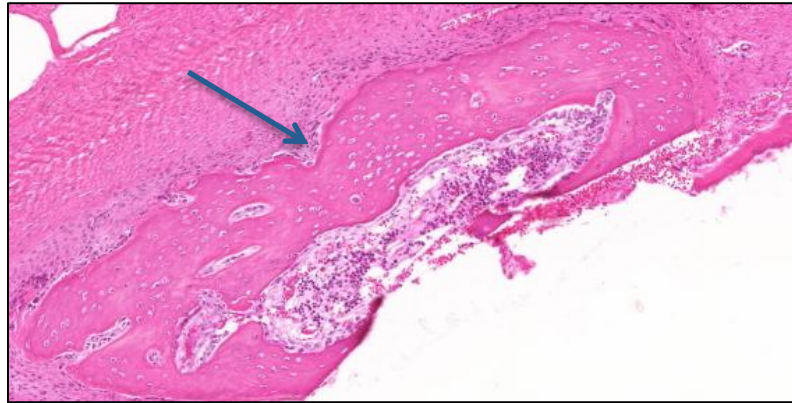


Figure 10: Animal 10, Group 2. Irregular bone formation with random osteocytes and vascular neof ormation.

The flap with bone dust (Group 3) had 33,3% of osseous formation. It was small and presented irregular images.



Figure 11: Histological hematoxylin-eosin image of the flap from Group 3, with bone dust. It demonstrate an irregular and small bone formation without osteocytes.

At Group 4, with empty tubular flap, seven animals (46,66%) had bone formation, small, irregular with few or without vascular tissue and few osteocytes.

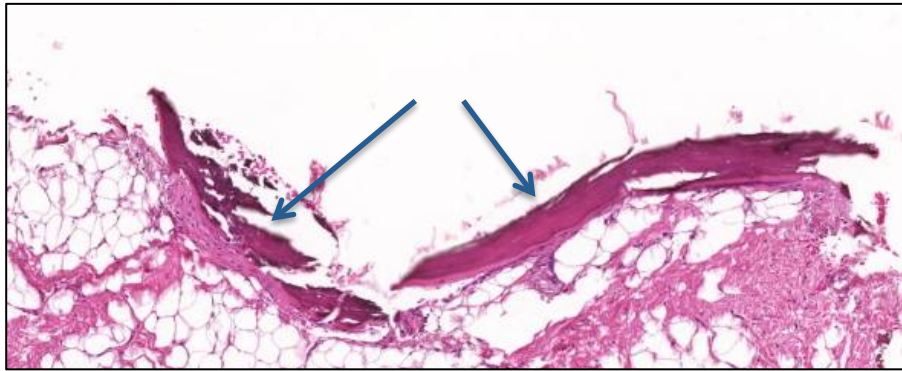


Figure 12: Animal 22, Group 4. Irregular, small and unorganized osseous tissue (10x).

At Group 5, the flap with PRP had 53,33% of osseous formation, however it was unorganized and irregular bone with few osteocytes.

Group 6, with bone dust end PRP, 60% presented positive bone images and it was an organized bone structure, regular, with osteocytes, osteoblasts and vascular formation inside the matrix.

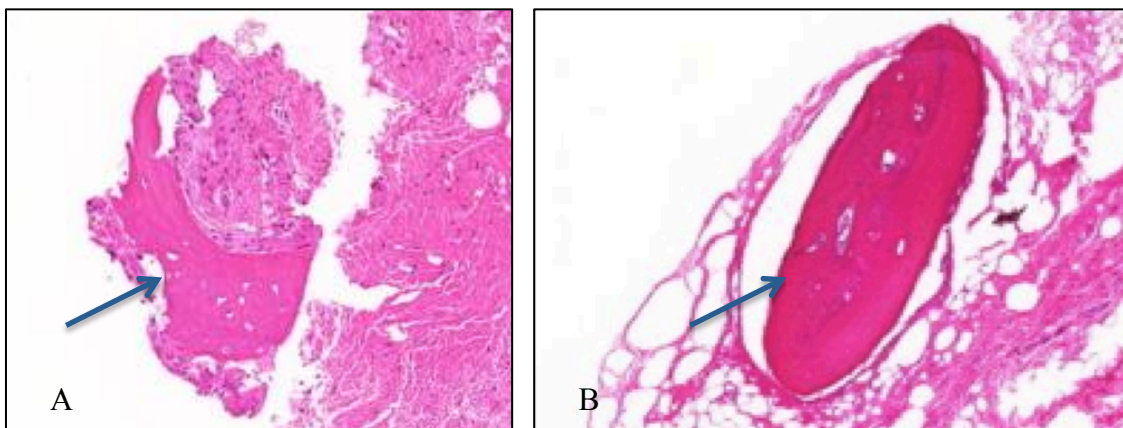


Figure 13: A – Animal 16, Group 5. Small and irregular osseous formation. B – Animal 15, Group 6. A regular bone image with osteocytes, osteoblasts and vascular formation.

At Group 7, with mesenchymal stem cell (MSC) and hyaluronic acid, 46,66% of the animals presented osseous formation, organized and regular with osteocytes, osteoblasts and vascular images inside the matrix.

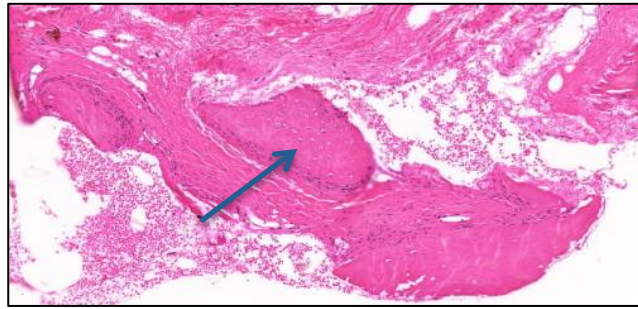


Figure 14: Animal 6, Group 7. Bone formation with osteocytes, osteoblasts and vascular formation.

At Group 8, with stem cell, hyaluronic acid and bone dust, 40% demonstrated osseous formation. Six of them had regular and organized bone structure and four were irregular ones. All of them presented organized tissue with osteocytes, osteoblasts and vascular neoformation.

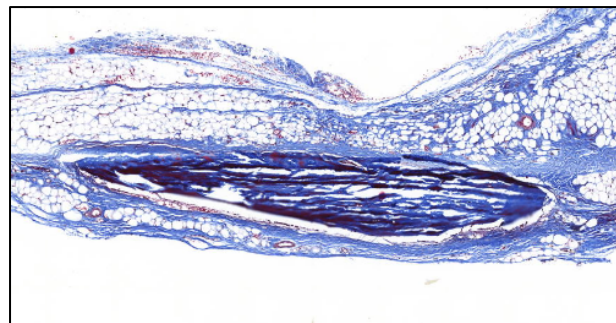


Figure 15: Animal 95, Group 8 (10x). Trichrome Masson stained tissue with regular form, osteocytes and calcification.

Group 9, with PRP and MSC, had 35,71% with regular and organized osseous formation. Group 10, with PRP, MSC and bone dust, had 50% of osseous formation, well organized and regular, with parallel osteocytes and vascular lacuna inside the bone matrix.

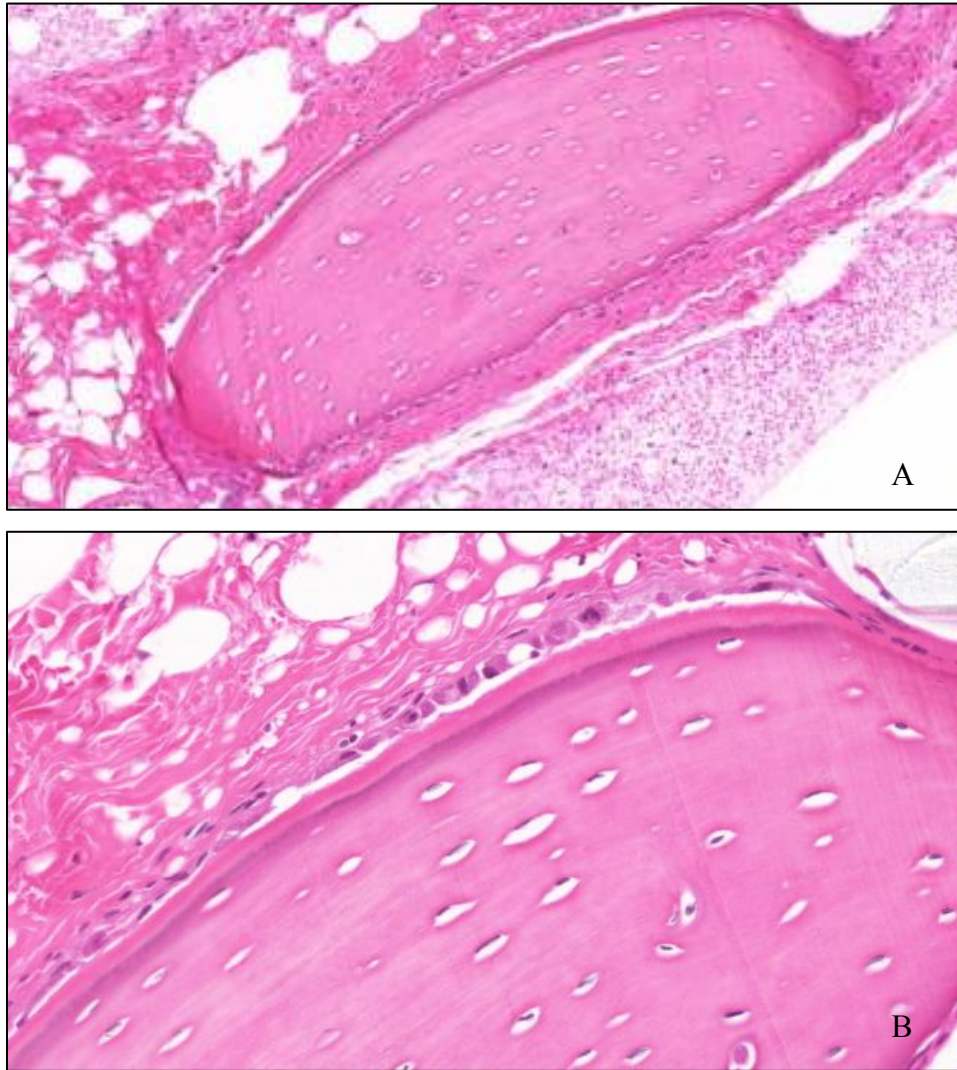


Figure 16: Animal 5, Group 9. A – Osseous formation, regular, organized, with many parallel osteocytes and peripheral osteoblastic activity (10x). B – Osteocytes organization (20x).

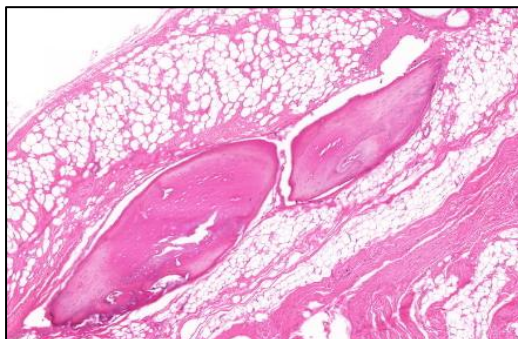


Figure 17: Animal 4, Group 10 (10x). Organized and regular osseous formation with osteocytes, osteoblasts, vascular neof ormation and calcification.

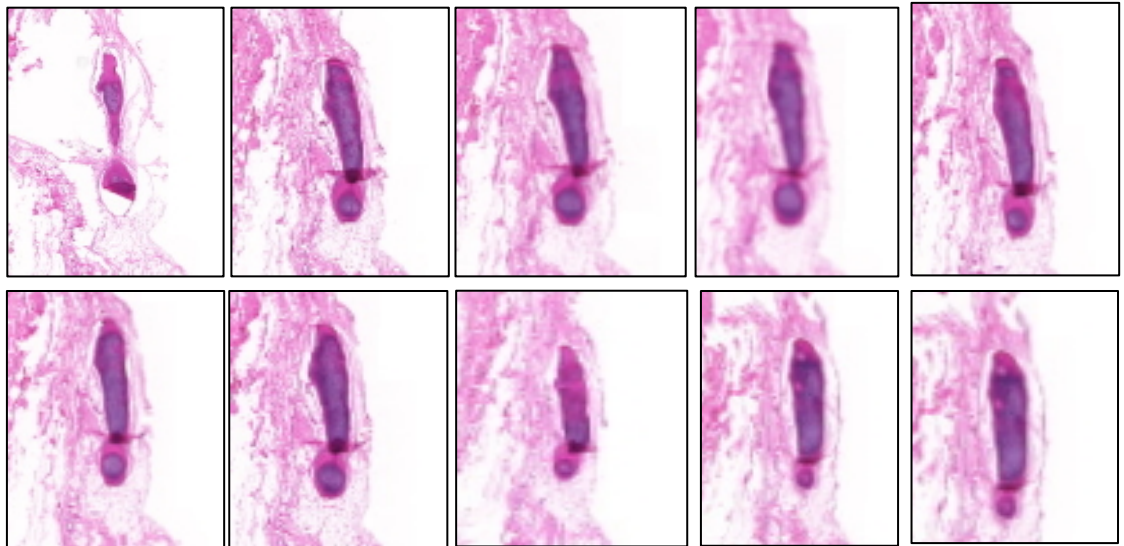


Figure 18: Animal 55, Group 10 (5x). Serial images of neofomed osseous tissue.

At Group 11, with empty tubular galea and periosteum flap, five animals (33,33%) demonstrated osseous formation, small, irregular and unorganized tissue. Group 12, with hyaluronic acid, 40% had osseous formation, small, unorganized tissue with few osteocytes.

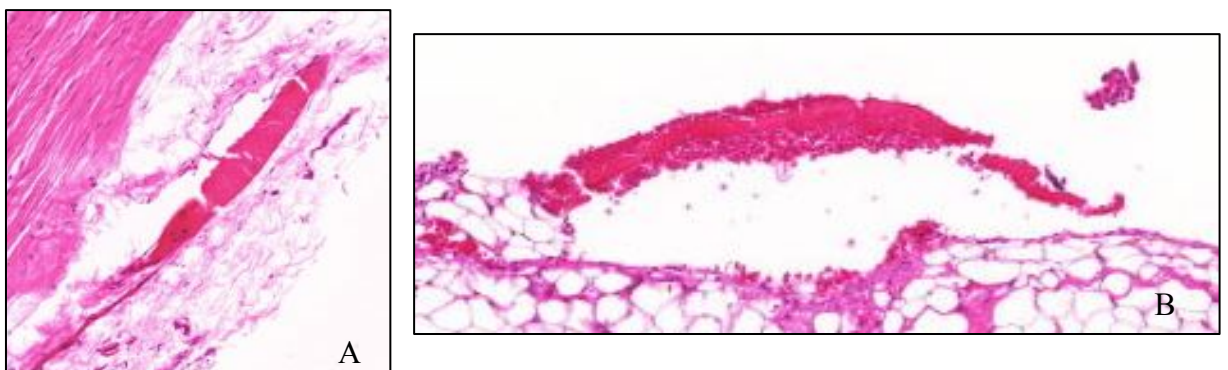


Figure 19: A - Animal 37, Group 11 (20x). Small osseous formation with few osteocytes. B – Animal 56, Group 12 (20x). Small and irregular tissue formation with few osteocytes.

Table 3: Mean area, perimeter and volume of the osseous formation at all groups. Red values indicate the lowest measurement and blue ones indicates the highest measurements numbers.

Groups	Mean area ( $\mu\text{m}^2$ )	Mean perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Mean volume ( $\mu\text{m}^3$ )
G2	2,81 (+/- 2,72)	0,09 (+/- 0,06)	252,04 (+/- 310,56)
G3	1,48 (+/- 2,18)	1,33 (+/- 2,76)	95,94 (+/-192,29)
G4	1,49 (+/-1,13)	0,09 (+/- 0,04)	83,54 (+/- 137,10)
G5	0,50 (+/- 0,28)	0,06 (+/- 0,04)	15,76 (+/- 15,96)
G6	2,12 (+/- 2,27)	0,09 (+/- 0,08)	140,56 (+/- 190,66)
G7	1,92 (+/- 1,27)	0,08 (+/- 0,04)	118,07 (+/- 132,80)
G8	2,29 (+/- 2,35)	0,10 (+/- 0,07)	165,76 (+/- 199,16)
G9	1,32 (+/- 0,95)	0,06 (+/- 0,02)	85,44 (+/-88,19)
G10	2,66 (+/- 3,20)	0,10 (+/- 0,05)	219,62 (+/- 391,52)
G11	0,88 (+/- 0,76)	0,04 (+/- 0,02)	47,63 (+/- 45,74)
G12	0,66 (+/- 0,46)	0,06 (+/- 0,03)	26,41 (+/- 31,10)

## DISCUSSION

The choice to use rabbits as experimental animals was made because it has an adequate calvaria size, larger than rats and it has a vascularized tissue by the temporal artery and vein. The rabbit has been used as experimental animal to bone defects and cranial reconstruction studies and in previous study of the same research group <sup>15,19,29</sup>.

The morcelized bone graft used into vascularized flaps demonstrated that the osseous cells and proteins from growth factor family are necessary to progenitor cells induction of the periosteum. It is considered an ideal biomaterial to bone neoformation because it has growth factors stored in the noncalcified matrix of morcellized bone graft, such as bone morphogenetic proteins and proteins of the fibroblast growth factor family, it induces progenitor cells within the periosteum to an osteogenic phenotype and result in new bone formation within the chambers <sup>30,31</sup>.

For this reason, the bone dust of the animal cortical calvarial bone was used and enriched with the platelet rich plasma and the mesenchymal stem cells.

The vascularized calvarial flaps are better than bone grafts because it has less absorption, better osseous integration and less infection rate and was demonstrated in previous researches to be able to increase new bone tissue formation<sup>15</sup>.

Macroscopic analysis demonstrated 100% vascularized tissue and no absorption of the flap and there was no sign of infection.

Radiographic results suggest osseous formation at the top of the calvaria where the flap was made, in lateral position images. At the dorsoventral view, there was few suggestive image of neoformed bone, may be because the osseous superposition of the rabbit calvaria makes it difficult to differentiate osseous structures. The anteroposterior view, aimed to differentiate the positivity of each side of the calvaria, did not demonstrated many positive results.

The major number of positivity occurred at lateral view, especially in Groups 5 and 6 at 30 and 60 days post operative.

The histological analysis confirmed bone formation in all groups with calvaria and periosteum flap, from the empty ones to the one with bone dust, platelet rich plasma and mesenchymal stem cell. However, the structure of this neoformed osseous tissue was different.

The area and perimeter had a large variety of values and did not demonstrate statistical difference between the groups. For this reason the bone was not considered by quantity but it was considered by quality and histological differences.

Group 6 (PRP and bone dust) demonstrated regular formation, but it was less organized than Groups 7, 8 and 9.

The more mature bone formation occurred at the association of bone dust, platelet rich plasma and mesenchymal stem cell.

## CONCLUSION

At this study, it was possible to demonstrate bone formation in vascularized flap of galea and periosteum at rabbit's calvaria and it demonstrated that the use of several enrichment materials of osseous cellular stimulation improved the quality of bone tissue organization.

The periosteum, bone dust, platelet rich plasma and mesenchymal stem cell produced osseous tissue. The periosteum and bone dust had small and irregular tissue formation. The platelet rich plasma formed bigger osseous tissue, however it was irregular and disorganized. The stem cell formed osseous tissue with better form, organization and matrix maturation. The best quality of bone tissue was found at the group with stem cell, platelet rich plasma and bone dust.

## REFERENCES

1. Baumeister S, Peek A, Friedman A, Levin LS, Marcus JR, Management of postneurosurgical bone flap loss caused by infection. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008, 122(6): 195-208.
2. Wang Z, Li Z, Dai T, Zong C, Liu Y, Liu B. Addition of adipose-derived stem cells to mesenchymal stem cell sheets improves bone formation at an ectopic site. *Int J of Mol Sci*. 2016, 17(70): 1-10.
3. Alam I, Asahina I, Seto I, Oda M, Enomoto S. Prefabricated vascularized bone flap: A tissue transformation technique for bone reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2001, 108(4): 952-8.
4. Goiato MC, Santos, DM, Haddad MF, Pesqueira AA, Carvalho Dekon SF, Zavanelli AC. Most frequent tumors in maxillofacial area rehabilitated through surgical reconstruction and prostheses. *J Craniofac Surg*. 2010, 21(2): 396-9.
5. Hara T, Santos CA, Farias A, Costa MJM, Cruz RJLC. Cranioplastia: parietal versus prótese customizada. *Rev Bras Cir Plast*. 2011, 26(1): 32-6.
6. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 2006, 85(11): 966-79.

7. Kumar AR, Bradley JP, Harshbarger R, Stevens F, Bell R, Moores L, Armonda R. Warfare-related craniectomy defect reconstruction: early success using custom alloplast implants. *Plast Reconstr Surg.* 2011, 127(3): 1279-87.
8. Chang SH, Tung KY, Wang YJ, Tsao YP, Ni TS, Liu HK. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites. *Plast Reconstr Surg.* 2010, 125(5):1393-402.
9. Laureano Filho JR, Castelo Branco BL, Andrade ESS, Barbosa JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007, 73(2):186-92.
10. Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1998, 101(3):577-81.
11. Netscher, DT, Stal S, Shenaq S. Management of residual cranial vault deformities. *Clin Plast Surg.* 1992, 19:301-13.
12. Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg.* 2004, 100(2):163-8.
13. Park HK, Dujovny M, Agner C, Diaz FG. Biomechanical properties of calvarium prosthesis. *Neurol Res.* 2001, 23(2-3):267-76.
14. Gosain AK, McCarthy JG, Staffenberg D, Glat PM, Simmons DJ. The histomorphologic changes in vascularized bone transfers and their interrelationship with the recipient sites: a 1-year study. *Plast Reconstr Surg.* 1996, 97(5):1001-13.
15. Brock RS, Viterbo F, Capel G, Domingues MA, Paschoalinotte EE, Labbé D. Galea and periosteum flap filled with bone fragments in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2013, 28(3): 195-201.
16. Saska S, Hochuli-Vieira E, Pereira Filho VA, Gabrielli MAC, Oliveira CF, Cancian DCJ. Implantes de polietileno poroso em calota de coelho. Análise histológica

comparativa. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilofac.* 2007, 7(3):49-58.

17. Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, Voelker M, Dersch R, Agarwal S, Fuchs- Winkelmann S, Paletta JRJ. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *PloS One.* 2011, 6(9):e25462.

18. Agrawal A, Baisakhiya N, Bholra N. Split calvarial graft to repair the large frontal bone defect. *J Maxilofac Oral Surg.* 2010, 9(2):166-9.

19. Hassanein AH, Arany PR, Couto RA, Clune JE, Glowacki J, Rogers GF, Mulliken JB, Greene AK. Cranial particulate bone graft osseous calvarial defects by osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2012, 129(5):796e-802e.

20. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: Biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 2014, 93(2): 109-16.

21. Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003, 130:4123-33.

22. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res.* 2005, 23:1300-7.

23. Silva DCB, Quinello C, Pires DA, Pinto JR, Mattar AC, Krebs VLJ, Ceccon MEJR. Uso de fatores de crescimento epidérmico e estimulador de colônias de granulócitos na prevenção e tratamento da enterocolite necrosante no recém-nascido. *Rev Paul Pediatr.* 2008, 26(2):170-5.

24. Cury VF, Guimarães MM. Fator de crescimento derivado de plaquetas na implantodontia. Novas perspectivas de tratamento para reconstrução óssea. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2012, 53:60-6.

25. Valiatti FB, Crispin D, Benfica C, Valiatti BB, Kramer CK, Canani LH. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011, 55(2): 106-13.

26. Medeiros AC, Mota HJ, Neto TA, Dantas Filho AM, Macedo LMB, Melo NMC. Efeitos do fator de crescimento de fibroblasto básico (FCF $\beta$ ) na cicatrização de

anastomoses do esôfago. Rev Col Bras Cir. 2004, 31(1):21-6.

27. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991, 9:641-50.

28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999, 284(5411):143-7.

29. Parro F, Viterbo F, Viterbo BG, Ueda A, Pinca F, Zanini S. Histological and radioisotopical analysis of the skull graft: an experimental study in rabbits. J Craniofac Surg. 1992, 3(4):203-6.

30. Brey EM, Cheng MH, Allori A, Atter'eld W, Chang DW, Patrick Jr CW, Miller MJM. Comparison of guided bone formation from periosteum and muscle fascia. Plast Reconstr Surg. 2007, 119(4):1216-22.

31. Cheng MH, Brey EM, Ulusal BG, Wei FC. Mandible augmentation for osseointegrated implants using tissue engineering strategies. Plast Reconstr Surg. 2006, 118(1):1e-4e.

### **Correspondence:**

Ryane Schmidt Brock

Rua Jandiatuba, 630/ 227

05716-150

São Paulo – SP, Brazil

Tel.: (55 11) 99112-3993

Fax: (55 11) 3476-3136

[ryanesbrock@gmail.com](mailto:ryanesbrock@gmail.com)

Conflict of interest: none

Financial support: none

None of the authors has a financial interest in any of the products, devices, or drugs mentioned in this manuscript.

Research performed at Experimental Surgery Laboratory, Surgery and Orthopedics Department, Medical School of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Brazil. Doctoral degree thesis, Postgraduate Program in General Surgery Basis, Medical School of Botucatu, UNESP. Tutor: Prof. Fausto Viterbo.



**Anexos**

## 9. Anexos:

### Anexo 1:

Parâmetros avaliados para a produção de PRP de cinco animais saudáveis. C1, C2, C3, C4 e C5 foram os animais (coelhos) utilizados para coleta de sangue. Ht - hematócrito, Hb - hemoglobina, GB – glóbulos brancos.

Amostra para PRP	Volume de sangue total (ml)	Dados do Hemograma				Volume de plasma (ml)
		Ht (%)	Hb (g/dl)	GB	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	
C1	4,5	49	15,3	6400	247	2,3
C2	3,6	50	17	6200	231	1,8
C3	5,1	48	16,1	5800	276	2,5
C4	6,0	45	14,7	6700	198	3,2
C5	6,1	43	13,5	6325	224	3,4
Volume total	25,3					<b>13,2</b>
Média	5,01	47	15,3	6285	235,2	

Anexo 2:

Dados do peso da gordura coletada dos coelhos, volume de HEPES e Colagenase I utilizados.

Número do coelho	Peso gordura (g)	Volume HEPES (ml)	Colagenase I (mg)
1	1,9	3,7	7,5
4	5,6	11,2	22,3
5	3,4	6,8	13,7
6	3,1	6,3	12,6
7	2,2	4,4	8,7
8	3,8	7,6	15,2
39	3,8	7,6	15,2
41	3,1	6,2	12,4
42	2,5	5,0	10,0
43	2,9	5,8	11,6
44	1,5	3,0	6,0
45	3,0	6,0	12,0
46	3,8	7,6	15,2
58	2,4	4,8	9,6
59	3,5	7,0	14,0
60	4,7	9,4	18,7
63	3,3	6,7	13,5
65	2,9	5,7	11,4
66	3,5	7,0	14,1
67	4,6	9,2	18,4
69	4,1	8,3	16,5
70	5,8	11,6	23,2
89	3,9	7,8	15,6
90	4,5	9,1	18,2
91	2,5	5,0	10,0
92	3,8	7,6	15,2
95	2,9	5,8	11,6
96	4,8	9,6	19,2

Anexo 3:

---

Valores de unidade Hounsfield utilizados:

---

Ar: -1000

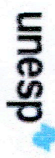
Água: 0

Sangue: +30 a +45

Tecidos moles: +100 a +300

Osso: +700 a +3000

---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA



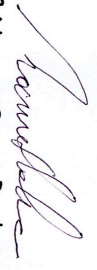
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99


# Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 963/2012) "Neoformação óssea: Retalho de gálea e perióstio preenchido com células tronco mesenquimais. Estudo em coelho", a ser conduzido por Ryane Schmidt Brock, orientado pelo Prof. Dr. Fausto Viterbo Neto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

**Sugerimos que seja feita analgesia pós-operatório.**

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 30/08/2012.

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Noeme Sousa Rocha  
Vice-Presidente da CEEA

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S. P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br

Anexo 5:

Jan 16, 2017

RE: SCS-16-01705R1, entitled "OSSEOUS FLAP OF GALEA AND PERIOSTEUM FILLED WITH MESENCHYMAL STEM CELLS, PLATELET RICH PLASMA, BONE DUST AND HYALURONIC ACID. STUDY IN RABBITS."

Dear Dr Brock,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Journal of Craniofacial Surgery. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

With Kind Regards,

Mutaz B. Habal, M.D.  
Editor-in-Chief  
Journal of Craniofacial Surgery

Journal of Craniofacial Surgery  
<http://scs.edmgr.com/>