

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – CLÍNICA MÉDICA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA  
NO REPARO ÓSSEO DE RATOS**

Autor: **Guilherme Genehr Fritscher**

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2011.

---

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL –  
PUCRS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA  
TESE DE DOUTORADO**

**GUILHERME GENEHR FRITSCHER**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NO REPARO  
ÓSSEO DE RATOS**

Porto Alegre, 2011.

---

---

**Guilherme Genehr Fritscher**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NO REPARO  
ÓSSEO DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

**Orientadora:**  
Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre, 2011.

---

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

F919a Fritscher, Guilherme Genehr

Avaliação da influência de células mononucleares de medula óssea no reparo ósseo de ratos / Guilherme Genehr Fritscher. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

000 p.: il. tab. Inclui um artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cantarelli Machado.

Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. CÉLULAS-TRONCO. 2. REGENERAÇÃO ÓSSEA. 3. MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS. 4. MEDULA ÓSSEA. 5. COLÁGENOS FIBRILARES. 6. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. 7. RATOS ENDOGÂMICOS WKY. 8. FEMUR/crescimento & desenvolvimento. 9. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 10. MODELOS ANIMAIS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 617.58

C.D.U. 616.718.4:611-018.4:599.323.4 (043.2)

N.L.M. QT 37

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

---

---

**DEDICATÓRIA:**

-----

*Dedico esse trabalho à minha  
família. Sua forte influência  
estimula a luta por novas  
vitórias*

**AGRADECIMENTOS:**

---

---

---

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado que me acompanha desde o mestrado sendo acima de tudo um exemplo a ser seguido em pesquisa científica.

À Pontifícia Universidade Católica, minha casa, aonde tenho muito orgulho de trabalhar, e que serve como exemplo de universidade voltada á excelência do ensino, pesquisa e empreendedorismo.

À Faculdade de Medicina, que me abriu as portas para que pudesse realizar o sonho de aprimorar minha titulação acadêmica.

À Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes, coordenadora do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, pela excelência do curso.

Ao Professor Jefferson Luis Braga da Silva, pela oportunidade de utilizar o Laboratório de Habilidades Médicas da Faculdade de Medicina – PUCRS.

À Faculdade de Odontologia, por me permitir fazer parte de seu corpo docente, e me apoiar durante essa fase de formação acadêmica.

Ao amigo Daniel Marinowic, pela ajuda na parte experimental do trabalho.

À colega e amiga Laura Campos, pela ajuda na análise das lâminas histológicas. Sua competência e dedicação foram fundamentais na elaboração desse trabalho.

Aos colegas Neimar Scolari e Lucas Santana, pela ajuda na fase cirúrgica.

---

---

A Miriam dos Santos Vianna e Michelle Flores Domingues, pela ajuda na obtenção das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

A todos que anonimamente, ou não, torceram pelo meu sucesso durante essa jornada.

Aos secretários Vanessa e Ernesto, pela empenho nos últimos anos.

---

---

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

---



---

## RESUMO

Os defeitos ósseos podem ser considerados críticos ou não, de acordo com sua capacidade de reparo normal pelo organismo evitando sequelas ósseas. O tempo decorrido para ocorrer esse reparo acabará trazendo alguma sequela temporária para o paciente. Esse estudo teve como objetivo avaliar e comparar a influência de células mesenquimais indiferenciadas, cultivadas sob membranas de colágeno, no reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratos. Dos 14 animais utilizados na pesquisa, dois foram doadores de medula óssea e doze compuseram a amostra. Os animais foram submetidos a quatro danos teciduais no fêmur direito: Grupo 1, com células mesenquimais indiferenciadas diluídas em soro fisiológico e recobertas por membrana de colágeno; Grupo 2, com células mesenquimais indiferenciadas diluídas em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC); Grupo 3, com células mesenquimais indiferenciadas diluídas em gel de HPMC e recobertas com membrana de colágeno; e Grupo 4, controle: reparo espontâneo. Quatro animais foram eutanasiados nos períodos de 7, 18 e 30 dias pós-operatórios e avaliados por meio de histologia com hematoxilina e eosina em microrscopia de luz e de microscopia eletrônica de varredura. Todos os grupos estudados tiveram reparo da cavidade óssea formada, muito embora somente o grupo controle tenha apresentado formação de cortical óssea na sua porção externa em 30 dias. O presente estudo sugere que o uso de células mesenquimais indiferenciadas não contribui para acelerar o processo de reparo ósseo em defeitos não críticos. O uso desses biomateriais pode inclusive atrasar o processo de reparo ósseo, uma vez que o organismo terá que reabsorver esse biomaterial, ao mesmo tempo que deverá estar formando novo osso.

**Palavras-Chave:** Regeneração óssea; materiais biocompatíveis; células-tronco.

---

---

## **ABSTRACT**

Bone defect may be considered critical or not. In many cases, the bone loss will be repaired by the organism normally, without leaving any bony sequels. But even then the time it takes to repair, will bring some temporary sequel to the patient. This study aimed to evaluate and compare the influence of mesenchymal stem cells cultured on collagen membranes in the femur bone repair in rats. 14 Kyoto rats were used. Two animals were marrow donors and twelve formed the sample. The animals were subjected to four tissue damage in the right femur: Group 1 - with mesenchymal stem cells diluted with normal saline and covered with collagen membrane; Group 2, with mesenchymal stem cells diluted into gel of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC); Group 3, with mesenchymal cells undifferentiated diluted into gel of HPMC and harvested by a collagen membrane; and Group 4, control group, spontaneous repair. Four animals were euthanized at 7, 18 and 30 days postoperatively and evaluated by hematoxilin and eosin histology and by scanning electron microscopy. The present study suggests that the use of mesenchymal stem cells do not contribute to accelerate the process of bone repair in not critical defects. All groups had fulfilled the bone cavity in 30 days, although only the control group had a cortical bone formation in its outer portion. The use of biomaterials may also delay the process of bone repair, since the body will have to absorb this biomaterial, instead of forming new bone.

**Keywords:** Bone regeneration; biocompatible materials, stem cells.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CEUA</b>	<b><i>Comissão de Ética para o Uso de Animais</i></b>
<b>CMI</b>	<b><i>Células Mesenquimais Indiferenciadas</i></b>
<b>CMMO</b>	<b><i>Células Mononucleares da Medula Óssea</i></b>
<b>D-MEM</b>	<b><i>Meio de Eagle Modificado por Dulbecco</i></b>
<b>COBEA</b>	<b><i>Conselho Brasileiro de Experimentação em Animais</i></b>
<b>DPBS</b>	<b><i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines</i></b>
<b>FEPPS</b>	<b><i>Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde</i></b>
<b>HE</b>	<b><i>Hematoxilina e Eosina</i></b>
<b>HPMC</b>	<b><i>Hidroxipropil Metilcelulose</i></b>
<b>kW</b>	<b><i>Quilowatts</i></b>
<b>MEV</b>	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i></b>
<b>PLGA</b>	<b><i>Ácido Polilático Poliglicólico</i></b>
<b>rpm</b>	<b><i>Rotações por minuto</i></b>
<b>®</b>	<b><i>Marca registrada</i></b>

---

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Radioimagem do reparo ósseo em fêmur de ratos. (B): A reconstrução tridimensional de calos formados (B1, B2, B5, B6) e cortes sagitais (B3, B4, B7, B8) foi obtida 14 dias após a fratura da tíbia. Adaptado de Granero-Malto 2009.....	23
Figura 2 – Fotografia da exposição do fêmur do rato .....	33
Figura 3 – Fotografia dos defeitos ósseos (seta) criados no fêmur de um rato.....	34
Figura 4 – Fotografia da colocação do gel de HPMC (seta) contendo células mononucleares de medula óssea no defeito do fêmur do rato. ....	34
Figura 5 – Fotografia do tratamento realizado nos defeitos ósseos do fêmur do rato. a) grupo controle; b) grupo tratado com CMMO diluído em soro fisiológico e recoberto com membrana de colágeno; c) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC e recoberto com membrana de colágeno; d) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC. ....	35
Figura 6 – Fotografia do aspecto da cicatrização cutânea com 18 dias de pós-operatório.....	36
Figura 7 – Fotografia do fêmur ressecado de um rato 18 dias após criação dos defeitos ósseos e dos tratamentos realizados: .....	36
Figura 8 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 um fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	43
Figura 9 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 um fêmur do rato, 7 dias após terapia. ....	43
Figura 10 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	44
Figura 11 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	44
Figura 12 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	45
Figura 13 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	45
Figura 14 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 7 dias após terapia .....	46
Figura 15 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 7 dias após terapia. ....	46

---

---

Figura 16 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato. 18 dias após terapia. ....	49
Figura 17 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato. 18 dias após terapia .....	49
Figura 18 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. ....	50
Figura 19 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 18 dias após terapia .....	50
Figura 20 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. ....	51
Figura 21 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. ....	51
Figura 22 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 18 dias após terapia .....	52
Figura 23 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 18 dias após terapia .....	52
Figura 24 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato, 30 dias após terapia .....	54
Figura 25 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. ....	55
Figura 26 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. ....	55
Figura 27 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 30 dias após terapia .....	56
Figura 28 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 30 dias após terapia .....	56
Figura 29 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Presença de gel de (A). ....	57
Figura 30 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia .....	58
Figura 31 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia .....	58
Figura 32 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. ....	59
Figura 33 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. ....	59
Figura 34 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 1, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A).....	62

---

---

Figura 35 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 2, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A).....63

Figura 36 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 3, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea..... 63

Figura 37 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 4, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A)..... 64

Figura 38 – Fotografia de um corte avaliado por MEV - Grupo 1 **Erro! Indicador não definido**

Figura 39 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV - Grupo 2... 65

Figura 40 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV - Grupo 3... 66

Figura 41 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV – Grupo 4. . 66

---

---

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparação do reparo ósseo entre os grupos sobre estágio analisado em cortes histológicos corados com HE, sete dias após procedimento cirúrgico e tratamento.....	42
Quadro 2. Comparação entre os grupos sobre o estágio de reparo ósseo analisado em microscopia com HE – 18 <sup>o</sup> dia.....	48
Quadro 3. Comparação entre os grupos sobre estágio de reparo ósseo analisado em microscopia com HE – 30 <sup>o</sup> dia.....	54
Quadro 4. Comparação das características do reparo ósseo nos diferentes dias avaliados através de secções histológicas coradas com HE, independente do tipo de terapia realizado .....	61

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISTA DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
1.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	18
1.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS.....	21
1.3 MEMBRANA DE COLÁGENO .....	24
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>30</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.2 ANIMAIS .....	30
3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DOS ANIMAIS DOADORES .....	31
3.4 TÉCNICA CIRÚRGICA.....	32
3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE DA REGENERAÇÃO ÓSSEA .	36
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS REPAROS ÓSSEOS .	37
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 ANÁLISE DOS TRATAMENTOS DOS DEFEITOS ÓSSEOS POR HISTOLOGIA COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	41
4.2 ANÁLISE DO TRATAMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	61
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>79</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

---



---

# **1 INTRODUÇÃO E REVISTA DA LITERATURA**

---

## **1 INTRODUÇÃO E REVISTA DA LITERATURA**

O avanço tecnológico tem possibilitado grande contribuição para a área da saúde. Inúmeras técnicas têm sido descritas a fim de auxiliar não só o diagnóstico, mas também influir no tratamento e melhorar o prognóstico.

A região bucomaxilofacial é com certeza uma das partes do organismo mais suscetíveis a danos, os quais podem ser, dentre outras, devido a patologias associadas aos dentes (caries, periodontites), bem como estarem relacionadas a traumas diversos ou mesmo apresentar outras lesões com potencial tanto benigno quanto maligno.

Os defeitos ósseos causados podem ser considerados críticos ou não. Em muitos casos as perdas ósseas ocorridas não serão reparadas fielmente pelo organismo o que acarretará perdas funcionais e/ou estéticas, por vezes, irreparáveis. Entretanto, em alguns casos o defeito ósseo será reparado normalmente pelo organismo sem sequelas ósseas futuras. Porém, mesmo nesses casos o tempo que leva para ocorrer o reparo, acabará trazendo alguma sequela temporária para o paciente.

A reabilitação ou mesmo a aceleração do reparo dessa área sempre foi, e continua sendo muito complexa. Diversas terapias, sejam com o emprego de enxertos autógenos (osso do próprio doador) ou alógenos (materiais sintéticos),

---

bem como com biomateriais (osso bovino, membranas de colágeno, membranas de ácido polilático e poliglicólico – PLGA – e implantes de titânio), têm sido realizadas. As evidências mostram suas vantagens, porém, devemos estar preparados para suas limitações.

A terapia com células-tronco pode se tornar um grande diferencial na recuperação de pacientes com esse tipo de sequela física, sendo esse um fator realmente importante para a melhora de qualidade do tratamento.

### 1.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O processo natural de reparo ósseo é suficiente para a consolidação de defeitos ósseos adquiridos, como por exemplo fraturas, desde que haja os requisitos básicos para esse reparo, como a adaptação dos bordos da ferida e a estabilidade do osso. Entretanto em alguns casos esses defeitos podem ser de tal magnitude (tumores, fraturas graves, reabsorções ósseas) que pode requerer outros elementos para possibilitar esse reparo.

O osso pode ser reparado das seguintes formas: osteogênese, osteoindução, osteocondução ou osteopromoção, sendo que o ideal seria a soma de todas elas<sup>1</sup>.

---

A osteogênese é considerada o padrão ouro na regeneração óssea. Ocorre através do transplante autógeno de células ósseas. Isso implica em uma área doadora, distante ou não da área a ser enxertada. Esse tipo de terapia fornece desde células osteoblásticas bem diferenciadas até células mesenquimais indiferenciadas<sup>1</sup>.

A osteoindução representa a capacidade de um material de formar osso em uma região onde nenhum osso iria se formar. Esses materiais não trabalham sozinhos, acabam recrutando células mesenquimais indiferenciadas, que são então estimuladas a se diferenciarem em células osteoblásticas. Como exemplo estariam as proteínas morfogenéticas ósseas e a matriz óssea desmineralizada<sup>2</sup>.

A osteocondução seria a propriedade apresentada pelos materiais de manter um arcabouço de forma a permitir a migração de células ósseas ou mesmo mesenquimais indiferenciadas para o interior do defeito e dessa forma contribuir para a neoformação óssea. Outra função importante da manutenção desse espaço seria a capacidade de impedir a migração de epitélio para o interior do defeito, uma vez que o reparo ósseo é mais demorado e, com isso, pode ocorrer a perda de volume ósseo reparado<sup>1</sup>. Entre os materiais podemos incluir a hidroxiapatita, sulfato de cálcio e o colágeno<sup>3</sup>.

A osteopromoção ocorre quando um material é adicionado ao sítio da regeneração óssea e sua presença exerce uma influência positiva sobre a formação óssea, quando em conjunto com outros fatores. Um exemplo seria o

---

plasma rico em plaquetas, que através de seus fatores de crescimento liberados no processo de cicatrização contribui para a diferenciação e multiplicação celular, porém a sua simples presença, sem fatores osteogênicos ou osteocondutores, não propicia a formação óssea<sup>1</sup>.

---

## 1.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Os problemas para a sociedade gerados por patologias reumáticas, doenças degenerativas, e traumatologia, tanto em termos assistenciais como econômico, têm justificado o desenvolvimento de técnicas de terapia celular e engenharia tecidual.

As CMMO adultas são células capazes de se diferenciarem em um variado número de células, e podem ser obtidas por meio de técnicas relativamente simples. Essas células têm o potencial de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos, e precursores osteogênicos. O conceito de usar as células-tronco no reparo tecidual tem progressivamente evoluído e o objetivo desta terapia é conseguir melhorar a habilidade ou mesmo substituir a capacidade reparadora, quando houver uma falha parcial ou completa do tecido em repará-lo sozinho. Nos últimos anos, se iniciaram os ensaios clínicos com o objetivo de avaliar o reparo possibilitado com a terapia de células-tronco com ou sem o uso de biomateriais associados<sup>4,5</sup>.

Terapias com células-tronco e engenharia de tecidos tem se tornado uma opção promissora para tratar defeitos ósseos no futuro. As células-tronco derivadas do cordão umbilical humano têm sido citadas como fontes seguras para aplicação neste tipo de terapia. Jager e colaboradores cultivaram células derivadas do cordão umbilical humano sobre membrana de colágeno e tricálcica, e xeno-transplantaram para defeitos realizados em fêmur de 46 ratos nus.

---

---

Encontraram células transplantadas viáveis na região estudada até 4 semanas após o transplante, sendo que nesses grupos houve um aumento no reparo ósseo quando comparado com o grupo sem células-tronco, que demonstra a viabilidade de se utilizar esse tipo de célula em estudos de regeneração óssea<sup>6</sup>.

Zou realizou um estudo *in vitro*, onde retirou células indiferenciadas da tíbia de porco e cultivou-as a fim de observar a sua diferenciação em células da linhagem osteogênica. Encontrou que o potencial de diferenciação depende de uma regulação genética quando mantidas em condições osteogênicas<sup>7,8</sup>.

Avaliando a capacidade reparadora de defeitos de cartilagem da articulação coxofemural, Lee injetou células-tronco direto na articulação. Encontrou maior reparo no grupo teste avaliados em 6 e 12 semanas, tanto histológica como morfológica<sup>9</sup>.

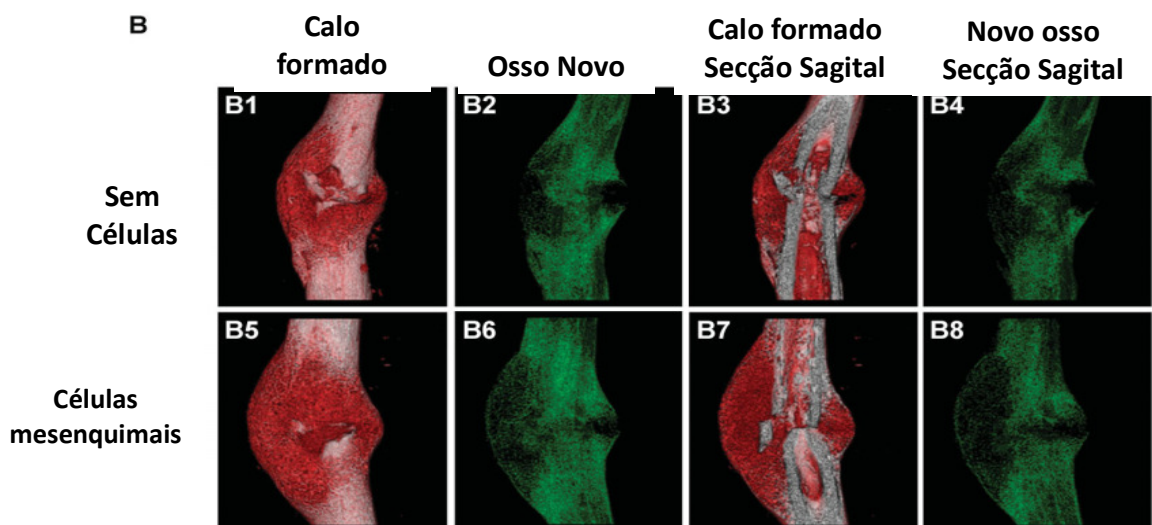
Em estudo realizado em porcos, Abukawa criou defeitos ósseos em mandíbulas, as quais eram reconstruídas com células-tronco cultivadas sobre membrana de ácido polilático poliglicólico. No grupo controle, o defeito não era reparado com nenhuma técnica, sendo permitida a cicatrização normal da lesão. Encontraram, no grupo teste, maior formação óssea tanto na avaliação radiográfica como em avaliação histológica após 6 semanas<sup>10</sup>.

Diversos têm sido os estudos em ratos que avaliaram o reparo ósseo através da utilização de células-tronco. O tempo de avaliação desse reparo varia conforme o objetivo do estudo, sendo que em 30 dias um reparo ósseo tardio já pode ser percebido. Estudos com análise e comparação histológica têm sido

---

realizados com a utilização de grupos experimentais compostos por até 5 animais, sendo possível obter dados estatísticos a partir desses resultados<sup>11, 12, 13</sup>.

A contribuição das células-tronco no reparo ósseo pode ser visualizada no exemplo abaixo ilustrado por Granero-Moltó em 2009 (Figura 1), onde comparou a diferença da utilização das células no reparo ósseo de fratura de fêmur de ratos. Os autores relataram que os volumes tecidual total, ósseo total, de tecido mole, de osso novo e de presença de hidroxapatita foi maior no grupo teste<sup>14</sup>.



**Figura 1 – Radioimagem do reparo ósseo em fêmur de ratos.** (B): A reconstrução tridimensional de calos formados (B1, B2, B5, B6) e cortes sagitais (B3, B4, B7, B8) foi obtida 14 dias após a fratura da tíbia. Adaptado de Granero-Malto 2009.



### 1.3 MEMBRANA DE COLÁGENO

Uma das grandes dificuldades na terapia com células-tronco é a forma de transplantá-las para que o defeito possa ser reparado. Tem se observado que a estabilidade dessas células no interior da lesão é fundamental para obter o sucesso dessa terapia. Estruturas de colágeno estão entre esses veículos capazes de transportar a célula tronco, por apresentar características estruturais que possibilitam a adesão celular<sup>15, 16</sup>.

A membrana de colágeno é um material natural (biomaterial), utilizado em regeneração óssea guiada, absorvível, que apresenta a finalidade de fornecer uma barreira mecânica para possibilitar o reparo ósseo, impedindo a interferência de fibroblastos na região. Além disso, as membranas de colágeno não necessitam reintervenção cirúrgica para sua retirada e o seu tempo de absorção pode ser modulado por agentes químicos<sup>17</sup>. Caiazza e colaboradores realizaram um estudo para avaliar a performance mecânica e a estrutura do osso neoformado ao redor de um implante de titânio através de técnicas de regeneração óssea guiada em ratos. Foram colocados dois implantes em fêmur de ratos e criados defeitos ao redor da porção superior desse implante. Os implantes do grupo teste foram recobertos por membrana de colágeno antes da sutura por planos, enquanto no grupo controle não. Os resultados radiográficos, mecânicos e histológicos mostraram que nos defeitos criados ocorreu reparo ósseo nos dois grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa,

---

embora com um leve favorecimento no grupo tratado com membrana de colágeno. Sugeriram, por fim, que essa barreira possa facilitar o reparo ósseo<sup>17</sup>.

Em um estudo com cachorros, Tal e colaboradores, compararam a regeneração ocorrida em defeitos realizados ao redor de dentes, que incluíam a remoção de osso, cimento e ligamento periodontal. Usaram como teste, osso bovino desproteínado particulado, com ou sem a adição de colágeno. No grupo controle o coágulo foi deixado se formar livremente. Todos os grupos foram divididos em mais dois subgrupos que diferiram entre si pela proteção ou não com membrana de colágeno. Os autores observaram melhor regeneração nos grupos onde a barreira com membrana de colágeno foi mantida<sup>18</sup>.

Ozmeriç e colaboradores realizaram também um estudo com cães, criando um defeito ósseo em duas paredes ao redor de dentes mandibulares. No grupo teste, foi colocada uma barreira com membrana de colágeno entre o dente e o defeito, enquanto o grupo controle não recebeu a membrana. As amostras foram analisadas aos 30, 60, e 90 dias pós-operatórios e os dados analisados por histomorfometria. O ganho ósseo e periodontal, assim como a recessão gengival, foi semelhante nos dois grupos. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos<sup>19</sup>.

Os defeitos intraósseos apresentam um grande desafio na periodontia, pois sua regeneração é difícil. Sculean e colaboradores realizaram um estudo em humanos comparando áreas de defeito intraósseos tratados com osso bovino liofilizado e recoberto com membrana de colágeno com a técnica de

---

retalho periodontal. Os resultados mostraram diferença significativa no nível clínico de inserção periodontal, mostrando que o emprego do osso liofilizado associado à membrana de colágeno é útil no tratamento desse tipo de defeito<sup>20</sup>.

As barreiras de colágeno tem sido também utilizadas como um veículo para transplantar as células-tronco. Para isso esses materiais necessitam ter adesão com essas células. Ao analisar a adesão das células-tronco mesenquimais em membranas de colágeno *in vitro*, Fritscher observou que não somente as células-tronco podem se aderir sobre essas membranas como também tem a capacidade de permitir a multiplicação e a diferenciação celular sobre ela, quando submetido a estímulos como o uso de proteína morfogenética óssea e/ou plasma rico em plaquetas<sup>16</sup>. As células encapsuladas nas membranas de colágeno formam um complexo com capacidade osteogênica, permitindo o depósito de fosfato de cálcio e fosfatase alcalina nas suas microesferas, além de permitir a atividade osteoindutora, através da diferenciação das células-tronco em linhagem osteogênica<sup>15</sup>.

Esse estudo optou por avaliar o início do reparo ósseo no fêmur de ratos, em um prazo de até 30 dias, com o objetivo de observar se é possível abreviar o processo de reparo ósseo. Dessa forma, poderia no futuro contribuir para melhorar e acelerar a cicatrização óssea e com isso minimizar as sequelas funcionais e estéticas bucofaciais.

---

---

## **2 OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência de células mononucleares de medula óssea (CMMO) no reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a)** Avaliar a influência da utilização das CMMO na velocidade do reparo ósseo;
  - b)** Avaliar a influência das CMMO na qualidade do reparo ósseo;
  - c)** Avaliar a capacidade das diferentes terapêuticas de reestabelecer o volume ósseo inicial;
  - d)** Avaliar a influência dos substratos: membrana de colágeno e gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), no reparo ósseo, associado as CMMO.
-

---

## **3 METODOLOGIA**

---

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Anexo I) e pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA - 10/00201) (Anexo II) da PUCRS. Foram seguidos os preceitos apresentados na Lei N° 11.794 de 11 de outubro de 2008 e do Guia de Uso e Cuidado com Animais de laboratório do *National Institutes of Health* (EUA) adotados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.2 ANIMAIS**

Foram utilizados, para este estudo, 14 ratos Kyoto, isogênicos, machos de mesma linhagem genética entre 55 e 75 dias de vida e 40-80 g de peso. Dois animais foram doadores de medula e doze compuseram a amostra. Os

---

ratos foram adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS.

Cada animal foi submetido a quatro danos teciduais no fêmur direito. Esses danos foram tratados da seguinte forma:

- a) **Grupo 1.** Com células mononucleares da medula óssea (CMMO) diluídas em soro fisiológico e recobertas por membrana de colágeno;
- b) **Grupo 2.** Com CMMO diluídas em gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC);
- c) **Grupo 3.** Com CMMO diluídas em gel de HPMC e recobertas com membrana de colágeno;
- d) **Grupo 4.** Grupo controle: reparo espontâneo, sem o uso de terapia acessória.

Quatro animais foram eutanasiados nos períodos de 7, 18 e 30 dias pós-operatórios.

### 3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA DOS ANIMAIS DOADORES

A extração de células da medula óssea dos ratos doadores foi realizada após a eutanásia dos mesmos com 0,4 – 0,6 ml de uma solução contendo 0,8% de ketamina e 0,2% de clorpromazina, conforme o peso do animal.

---



As células da medula óssea foram obtidas das diáfises do fêmur e tíbia e preparadas para o transplante.

A medula óssea foi mobilizada com agulha fina, lavada com uma pequena quantidade de meio de cultura e, sequencialmente, passada através de agulhas 12 e 22 g para produzir uma suspensão de células individuais.

As células da medula óssea foram separadas, por centrifugação, em gradiente de densidade usando Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma Diagnostics, USA). Para tanto, as células da medula óssea foram ressuspensas com 2 ml de meio de cultura D-MEM colocadas em 2 ml de Histopaque<sup>®</sup> e centrifugadas (MSE Mistral 2000, USA) a 400 g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 10 ml de DPBS e centrifugada a 1.500 rpm, por 3 minutos. A quantificação e viabilidade celular foram avaliadas pelo método de exclusão com azul de tripan. As células foram ressuspensas a uma densidade de 10<sup>5</sup> células/mL em uma solução contendo 1% HPMC em DPBS.

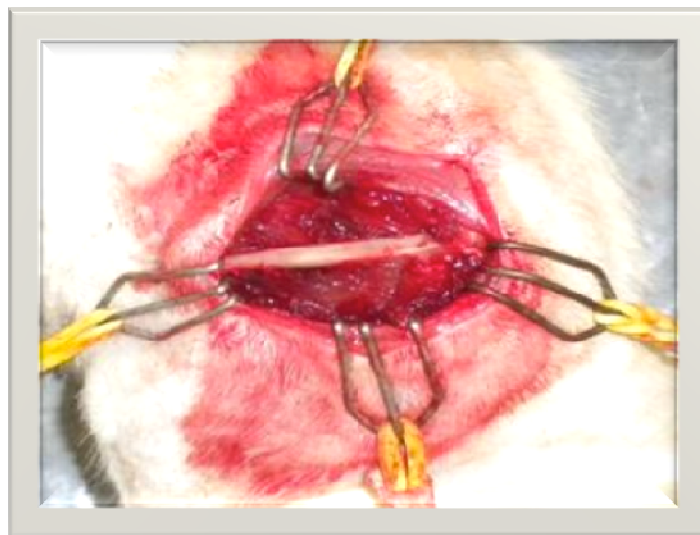
### 3.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais foram operados em sala especial do Laboratório de Microcirurgia da Faculdade de Medicina da PUCRS. Os ratos foram submetidos a anestesia geral com a aplicação de injeção intramuscular de Cloridrato de Dihidro-tiazina (Ropum<sup>®</sup>) e Ketamina (Dopalem<sup>®</sup>) diluídos em uma concentração

---

de 1:1 e dose de 0,1 ml/100 g de peso. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em decúbito ventral e foi realizada a tricotomia do membro posterior esquerdo de cada rato com lâmina de barbear montada e realizada a antissepsia do local com digluconato de clorexidina a 2 %.

A incisão foi realizada com lâmina de bisturi nº 15, por planos, na região posterior da coxa dos ratos. A integridade do periósteo no descolamento foi preservada sob pena de descartar o animal do experimento (Figura 2).



**Figura 2 – Fotografia da exposição do fêmur do rato**

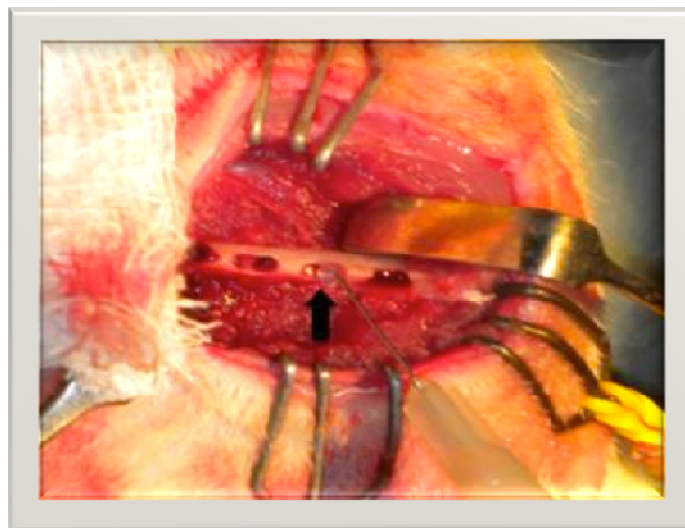
Uma vez exposto o fêmur dos animais, foram realizadas quatro cavidades ósseas bi-corticais de 3 mm de comprimento por 3 mm de largura com broca esférica nº 2 (Carbide®) à 20.000 rpm sob irrigação constante de soro fisiológico a 0,9 % (Figura 3). Essas quatro cavidades foram tratadas

---

conforme a metodologia descrita anteriormente (Figuras 4 e 5). A sutura foi realizada por planos teciduais com fio monofilamentado de Nylon 4-0.



**Figura 3 – Fotografia dos defeitos ósseos (seta) criados no fêmur de um rato.**



**Figura 4 – Fotografia da colocação do gel de HPMC (seta) contendo células mononucleares de medula óssea no defeito do fêmur do rato.**



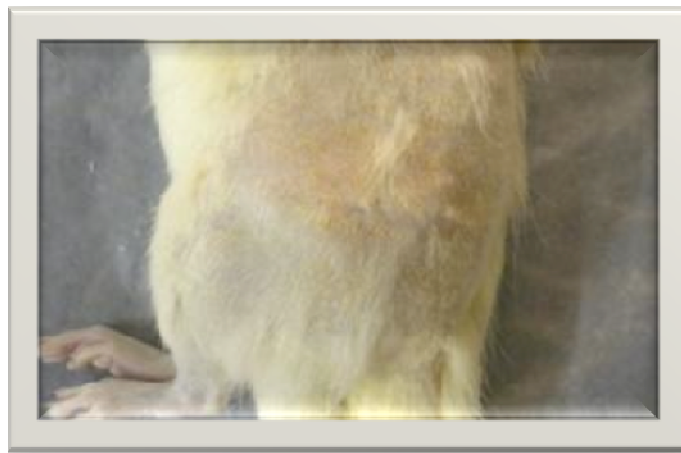
**Figura 5 – Fotografia do tratamento realizado nos defeitos ósseos do fêmur do rato.** a) grupo controle; b) grupo tratado com CMMO diluído em soro fisiológico e recoberto com membrana de colágeno; c) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC e recoberto com membrana de colágeno; d) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC.

Todos os ratos foram colocados em gaiolas individuais, e receberam ração padronizada e água *ad libitum*, e foram mantidos em ambiente com controle de temperatura e luz claro/escuro de 12 horas. Receberam analgesia pós-operatória com Paracetamol 200 mg/kg intramuscular durante dois dias.

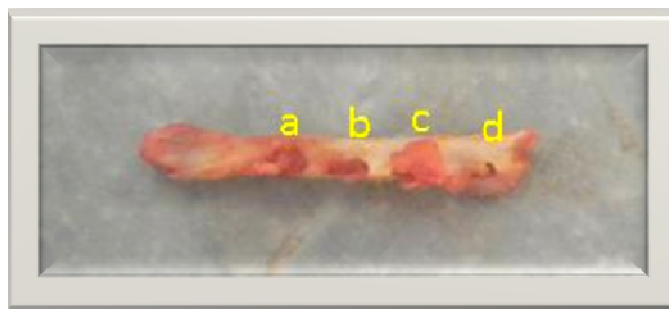
Os animais estudados foram eutanasiados com a mesma técnica empregada nos animais doadores da medula óssea, nos períodos correspondentes a cada grupo.

### 3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE DA REGENERAÇÃO ÓSSEA

O fêmur esquerdo de cada animal foi ressecado utilizando o mesmo acesso cirúrgico e armazenado em formalina tamponada a 10%, para obter fixação do espécime (Figuras 6 e 7).



**Figura 6 – Fotografia do aspecto da cicatrização cutânea com 18 dias de pós-operatório.**



**Figura 7 – Fotografia do fêmur ressecado de um rato 18 dias após criação dos defeitos ósseos e dos tratamentos realizados: a) grupo controle; b) grupo tratado com CMMO diluído em soro fisiológico e recoberto com membrana de colágeno; c) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC e recoberto com membrana de colágeno; d) grupo tratado com CMMO diluído em HPMC.**

Estas peças foram descalcificadas em ácido nítrico e posteriormente cortadas na área de interesse para facilitar sua inclusão em parafina de acordo com os procedimentos de rotina do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Após a inclusão em parafina, as peças foram cortadas e coradas com HE, e foram analisadas ao microscópio com amplificação da imagem de 40 e 400 x, no Laboratório de Histologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

### 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS REPAROS ÓSSEOS

Foram realizadas análises das superfícies dos reparos ósseos com microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 20.0 kW, em magnificação de 500 x, 1.000 x, 4.000 x e 8.000 x do fêmur de um rato de cada grupo nos dias 7 e 30 após a realização dos defeitos ósseos e tratamento.

### 3.7 ANÁLISE DOS DADOS

Foram realizadas análises descritivas das lâminas histológicas nos diferentes tempos estudados. Cada defeito ósseo foi descrito independentemente dos outros defeitos, e realizada por um avaliador que

---

desconhecia os grupos estudados. A partir dessa descrição procurou-se verificar as diferenças e semelhanças de reparo, presentes nesses defeitos.

Essa avaliação também permitiu estabelecer diferenças no reparo ósseo nos diferentes períodos de tempo estudados: sete, 18 e 30 dias.

Uma descrição das imagens obtidas na microscopia de varredura também foi realizada, a fim de identificar possíveis interações celulares com os materiais associados.

---

---

## **4 RESULTADOS**

---



## **4 RESULTADOS**

Em cada grupo experimental ocorreu uma fratura patológica do fêmur, sendo que esses animais foram excluídos do estudo, restando nove animais.

Entre eles, um de cada grupo foi selecionado para realização da análise por microscopia eletrônica de varredura.

As análises dos resultados obtidos na regeneração de defeitos ósseos em fêmur tratados com: células mononucleares de medula óssea CMMO diluídas em soro fisiológico e cobertos com membrana de colágeno (Grupo 1); CMMO diluídas em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Grupo 2); CMMO diluídas em HPMC e recobertas por membrana de colágeno (Grupo 3); e sem tratamento, ou seja, grupo controle (Grupo 4), foram realizadas em sete, 18 e 30 dias após o procedimento cirúrgico e tratamento.

Os dados descritivos apresentados a seguir são baseados nas observações das secções histológicas coradas com HE e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No processamento histológico ocorreu uma falha na confecção das lâminas, sendo excluídos um animal de cada período, restando 3 animais para análise histológica com HE.

---

#### 4.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DOS TRATAMENTOS DOS DEFEITOS ÓSSEOS POR HISTOLOGIA COM COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Os resultados foram avaliados a partir da análise de um corte transversal dos defeitos ósseos criados no fêmures dos ratos. O primeiro período analisado foi sete dias após a criação dos defeitos. Nesse primeiro momento pode-se perceber que o Grupo 1 apresentava defeito ósseo cortical com hemorragia em seu interior sem preencher toda a cavidade, e ainda presença de tecido conjuntivo fibroso com infiltrado inflamatório agudo (Figura 8 e 9).

O Grupo 2 teve o defeito ósseo cortical parcialmente preenchido por tecido conjuntivo fibroso, infiltrado inflamatório agudo, presença de hemorragia, e material exógeno (Figuras 10 e 11).

Em relação ao Grupo 3, encontrou-se um preenchimento de toda a cavidade óssea, apresentando no seu interior tecido conjuntivo fibroso com processo inflamatório agudo. Membrana de colágeno revestia a cavidade. Houve ainda a presença de supuração, no interior da lesão (Figuras 12 e 13).

No Grupo Controle (4) notou-se também um preenchimento parcial do defeito ósseo, tendo a presença de tecido conjuntivo fibroso, além de neutrófilos e hemorragia (Figuras 13 e 14).

O quadro 1 apresenta um resumo das características observadas nas secções dos defeitos ósseos avaliados com coloração de HE, sete dias após o procedimento cirúrgico e tratamento. É possível observar que houve uma maior

---

presença processo inflamatório agudo, hemorragia e tecido conjuntivo fibroso. Nenhum grupo apresentou neoformação óssea nessa etapa. Um grupo contendo gel de HPMC e membrana de colágeno apresentou supuração.

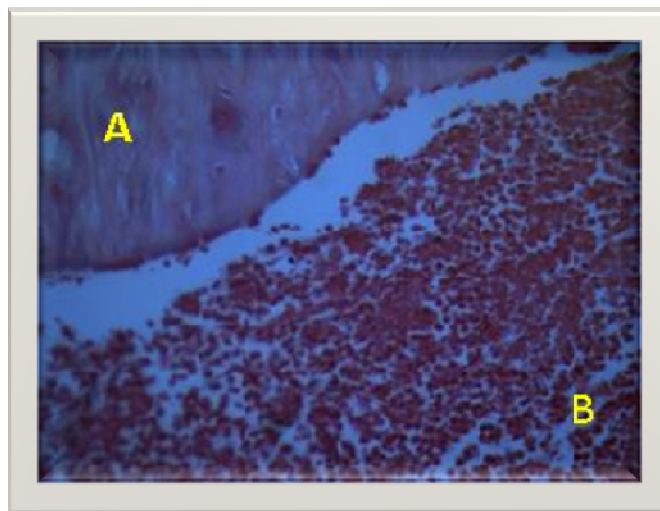
**Quadro 1. Comparação do reparo ósseo entre os grupos sobre estágio analisado em cortes histológicos corados com HE, sete dias após procedimento cirúrgico e tratamento.**

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Defeito Preenchido	X	X	V	X
Defeito não preenchido	V	V	X	V
Cortical externa reparada	X	X	X	X
Tecido conjuntivo fibroso	V	V	V	V
Hemorragia	V	V	V	V
Processo inflamatório agudo	V	V	V	V
Processo inflamatório crônico	X	X	X	X
Neoformação óssea	X	X	X	X
Neoformação vascular	X	X	X	X
Material exógeno	X	V	V	X
Supuração	X	X	V	X

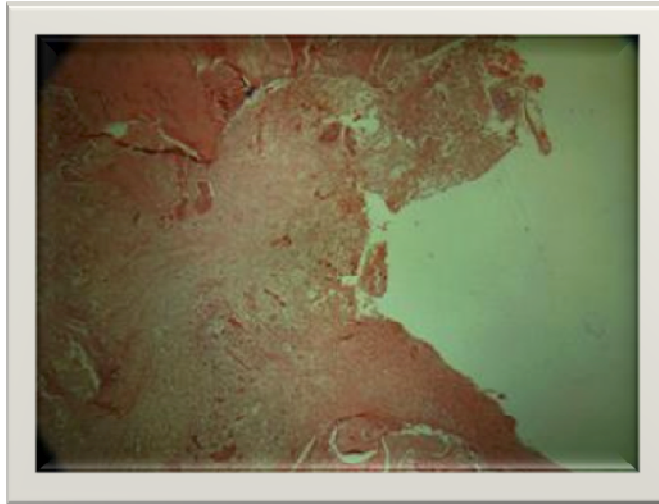
Legenda: X representa ausência nos grupos avaliados. V: representa presença nos grupos avaliados.



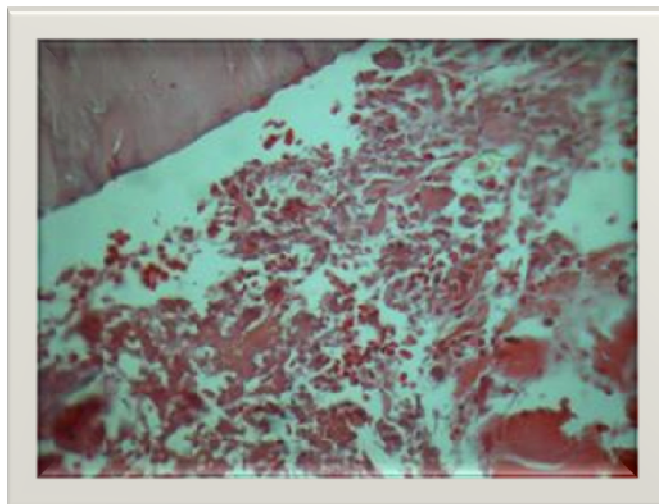
**Figura 8 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 um fêmur do rato, 7 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 40x.**



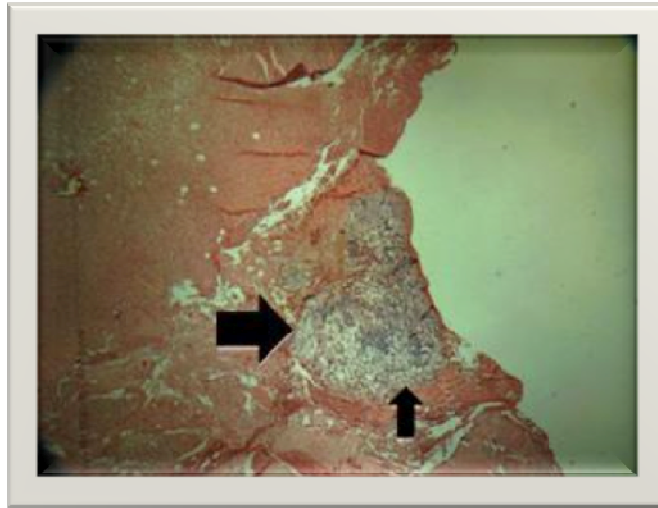
**Figura 9 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 um fêmur do rato, 7 dias após terapia. A. Tecido ósseo cortical. B. Hemorragia. Coloração com HE. Aumento de 400x.**



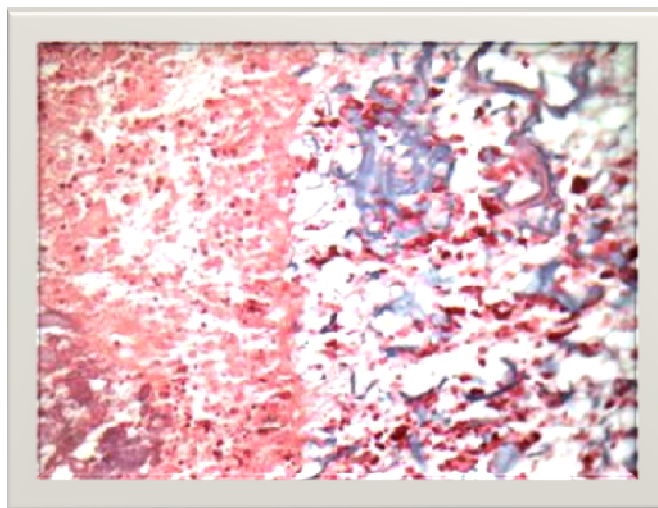
**Figura 10 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 7 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 40x.**



**Figura 11 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 7 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.**

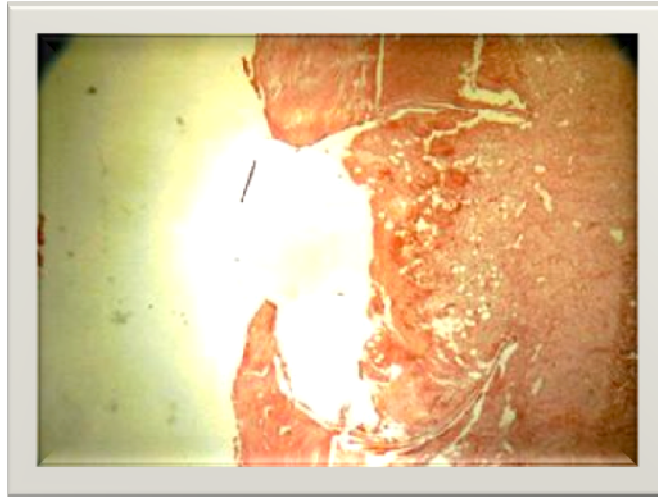


**Figura 12 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 7 dias após terapia. Presença de membrana de colágeno delimitando a cavidade (entre setas). Coloração com HE. Aumento de 40x.**

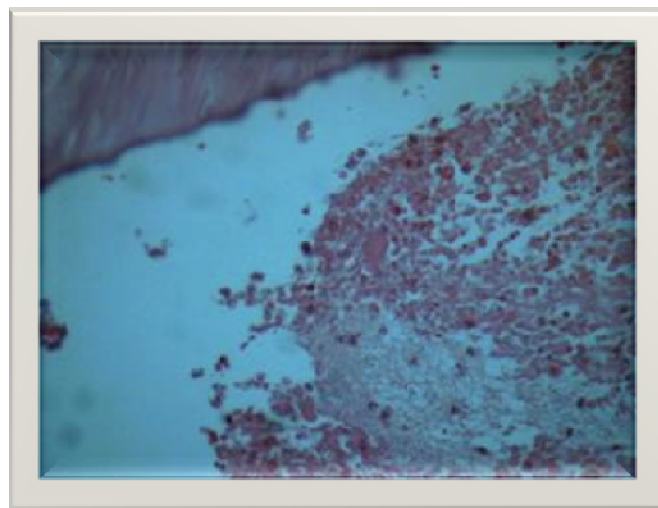


**Figura 13 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do**

**rato, 7 dias após terapia.** Coloração com HE.  
Aumento de 400x.



**Figura 14 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 7 dias após terapia.** Coloração com HE.  
Aumento de 40x.



**Figura 15 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do**

**rato, 7 dias após terapia.** Coloração com HE.  
Aumento de 400x.

Na análise das secções coradas com HE após 18 dias, observou-se uma alteração no padrão inflamatório em todos os grupos, com predomínio da fase crônica.

No Grupo 1 visualizou-se uma alteração do processo inflamatório, agora com predomínio de linfócitos e plasmócitos. Apresentou ainda uma pequena área na parte interna do defeito sugerindo neoformação óssea (Figuras 16 e 17).

No Grupo 2 encontrou-se defeito ósseo preenchido por gel de HPMC, com pouca presença de células inflamatórias. Não houve presença de neoformação óssea figuras (18 e 19).

Avaliando o Grupo 3 visualizou-se defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório crônico, hemorragia e, ainda, observou-se neoformação óssea no limite profundo da lesão (Figuras 20 e 21).

No Grupo 4 observou-se defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso por processo inflamatório crônico. Não houve presença de neoformação óssea (Figuras 22 e 23).

O Quadro 2 apresenta as características observadas nas secções dos defeitos ósseos avaliados com coloração de HE, 18 dias após o procedimento cirúrgico e tratamento. Percebeu-se um padrão inflamatório crônico, além da presença de tecido conjuntivo fibroso em todos os grupos. Começou a se

---

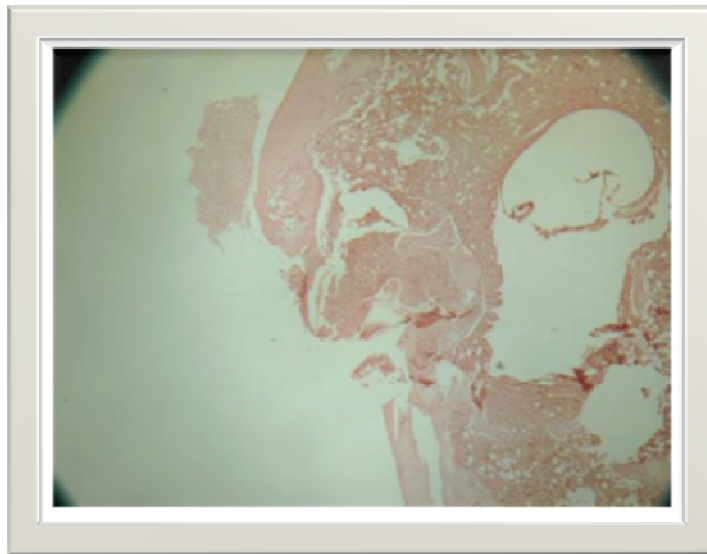


visualizar neoformação óssea, porém sem a presença de neoformação vascular. O Grupo 2 apresentou um processo de reparo mais lento que os outros grupo.

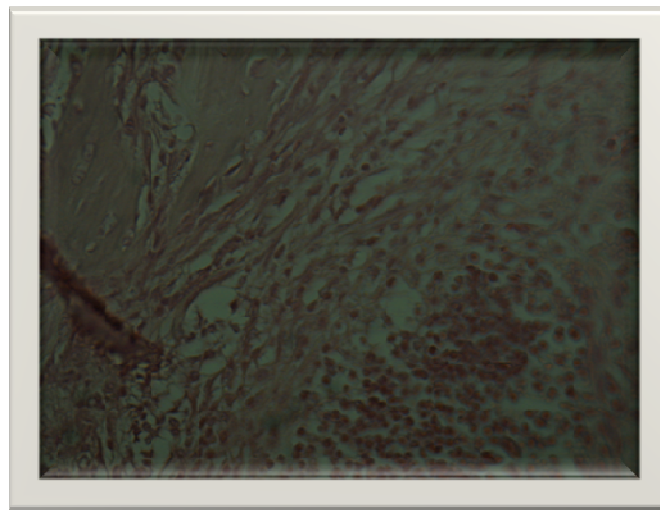
**Quadro 2. Comparação entre os grupos sobre o estágio de reparo ósseo analisado em microscopia com HE – 18º dia.**

	1	2	3	4
Defeito Preenchido	x	v	v	v
Defeito não preenchido	v	x	x	x
Cortical externa reparada	x	x	x	x
Tecido conjuntivo fibroso	v	x	v	v
Hemorragia	v	x	v	x
Processo inflamatório agudo	x	x	x	x
Processo inflamatório crônico	v	v	v	v
Neoformação óssea	v	x	v	x
Neoformação vascular	x	x	x	x
Material exógeno	x	v	x	x
Supuração	x	x	x	x

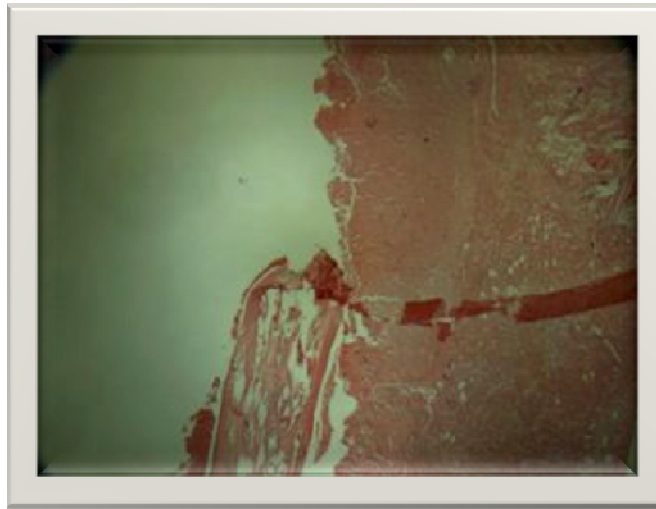
Legenda: x representa ausência nos grupos avaliados. v: representa presença nos grupos avaliados.



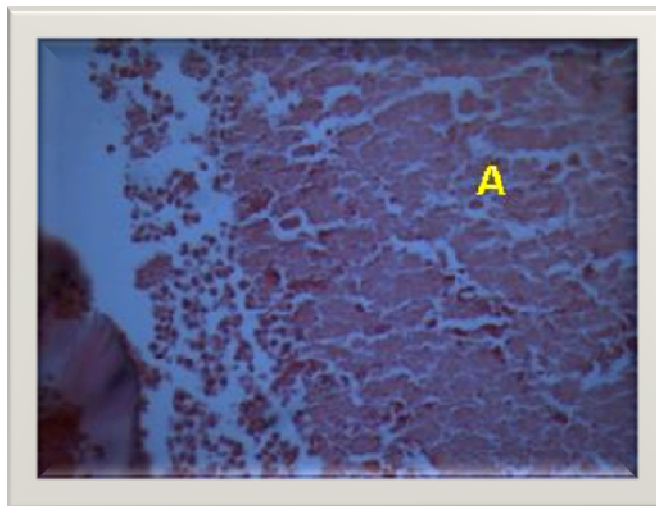
**Figura 16 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato. 18 dias após terapia.**



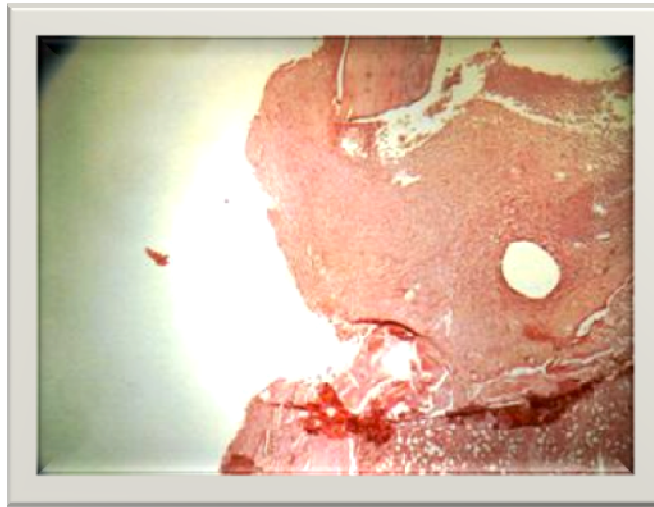
**Figura 17 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato. 18 dias após terapia.**



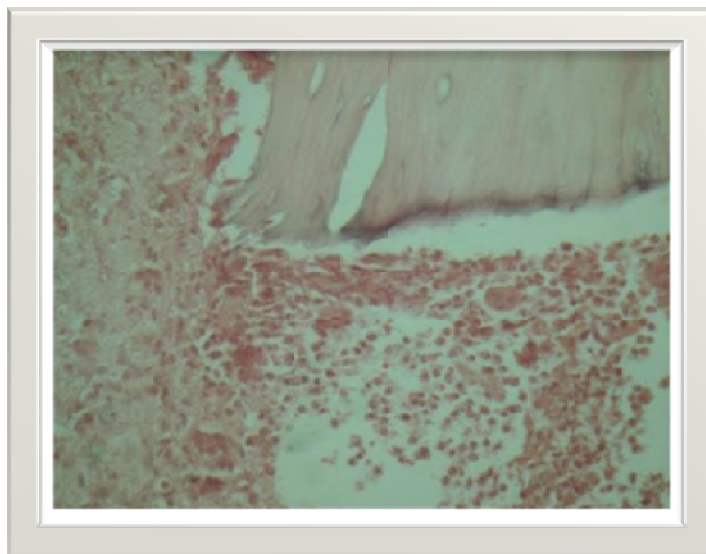
**Figura 18 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 40x.**



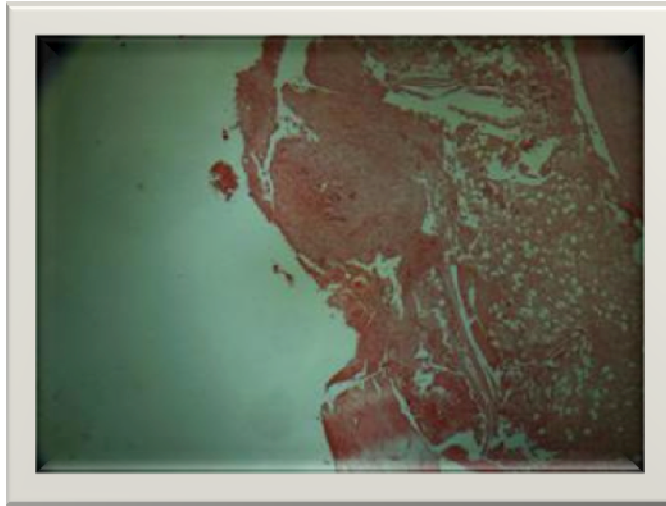
**Figura 19 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. A. Gel CMC. Coloração com HE. Aumento de 400x.**



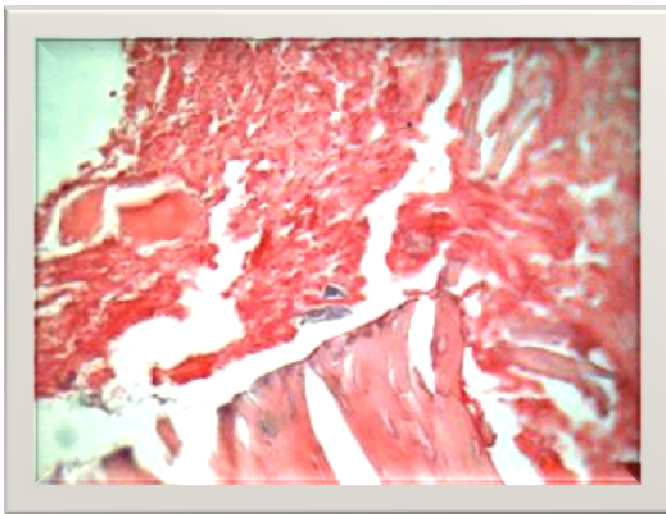
**Figura 20 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 40x.**



**Figura 21 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. Presença de osso imaturo mostrar osso imaturo. 18º dia pós operatório. Aumento de 400x.**



**Figura 22** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 40x.



**Figura 23** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 18 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.

No trigésimo dia pós criação de defeito e tratamento todos os defeitos já estavam preenchidos por tecido de reparo ósseo. Somente o Grupo Controle apresentou cortical externa formada e fechando o defeito ósseo(Figuras 32 e 33).

O Grupo 1 apresentou uma formação óssea, com algumas áreas já corticalizadas na parte mais superior do defeito, porém sem fechar a cavidade óssea (Figuras 24 e 25).

No Grupo 2 encontrou-se o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso, material exógeno e tecido ósseo neoformado. Presença do gel de HPMC limitando a formação óssea nas partes mais externas do defeito ósseo (Figuras 26, 27 e 28).

Em relação ao Grupo 3 notou-se nitidamente o gel de HPMC também ocupando a porção mais externa do defeito ósseo. Não houve formação óssea na parte externa da lesão (Figuras 29, 30 e 31) .

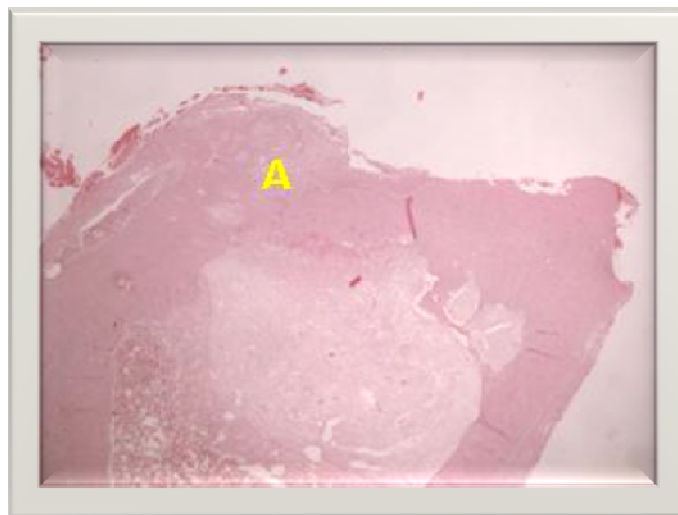
O quadro 3 apresenta as características descritas nas secções dos defeitos ósseos avaliados com coloração de HE, 30 dias após o procedimento cirúrgico e tratamento. O Grupo 2 foi o que apresentou pior quadro de reparo ósseo. Existiu uma presença marcante ainda do biomaterial nesse período. Nessa fase todos os grupos apresentaram neoformação óssea, embora somente o grupo controle apresentou corticalização da parte mais externa do defeito.

---

**Quadro 3. Comparação entre os grupos sobre estágio de reparo ósseo analisado em microscopia com HE – 30º dia.**

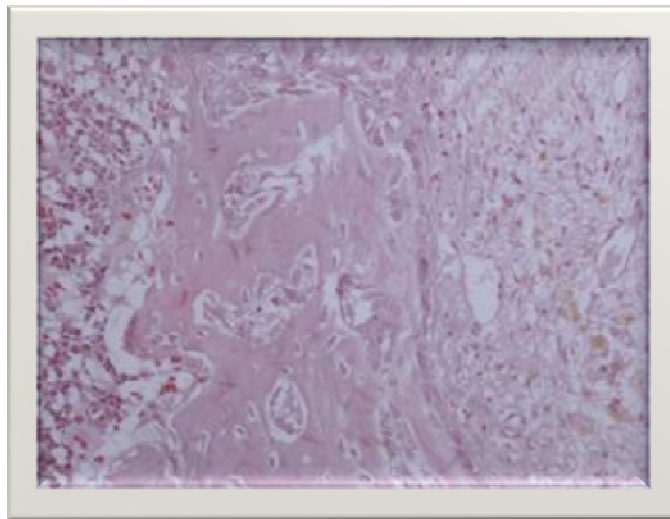
	1	2	3	4
<b>Defeito Preenchido</b>	V	V	V	V
<b>Defeito não preenchido</b>	X	X	X	X
<b>Cortical externa reparada</b>	X	X	X	V
<b>Tecido conjuntivo fibroso</b>	V	V	V	V
<b>Hemorragia</b>	V	V	X	X
<b>Processo inflamatório agudo</b>	X	X	X	X
<b>Processo inflamatório crônico</b>	V	V	V	V
<b>Neoformação óssea</b>	V	V	V	V
<b>Neoformação vascular</b>	V	X	V	X
<b>Material exógeno</b>	V	V	V	X
<b>Supuração</b>	X	X	X	X

Legenda: X representa ausência nos grupos avaliados. V: representa presença nos grupos avaliados.

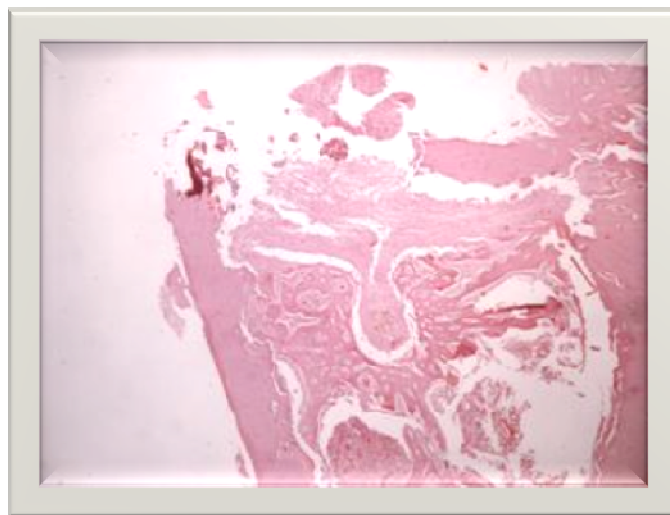


**Figura 24 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Defeito ósseo com**

neoformação óssea com preenchimento da cavidade (A). Coloração com HE. Aumento de 40x.



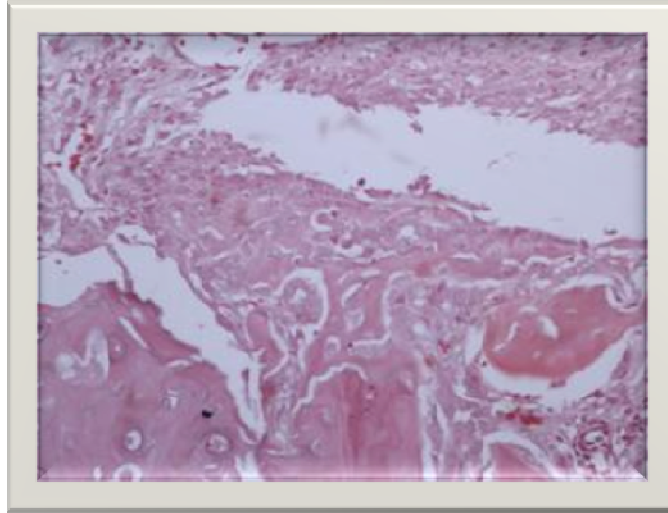
**Figura 25 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 1 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.**



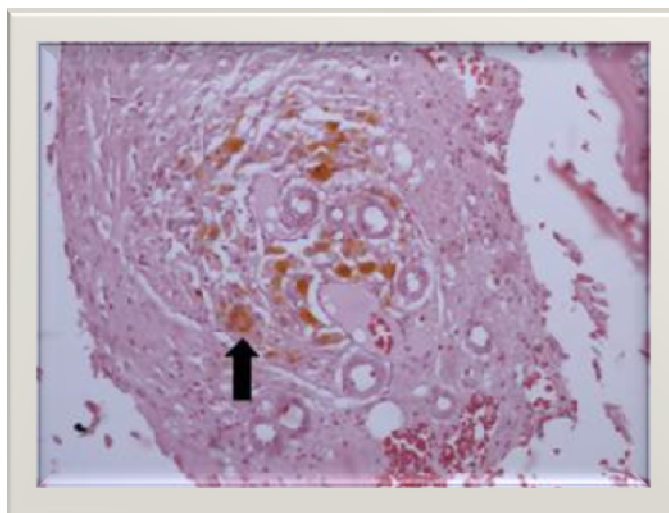
**Figura 26 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do**



**rato, 30 dias após terapia.** Coloração com HE.  
Aumento de 40x.

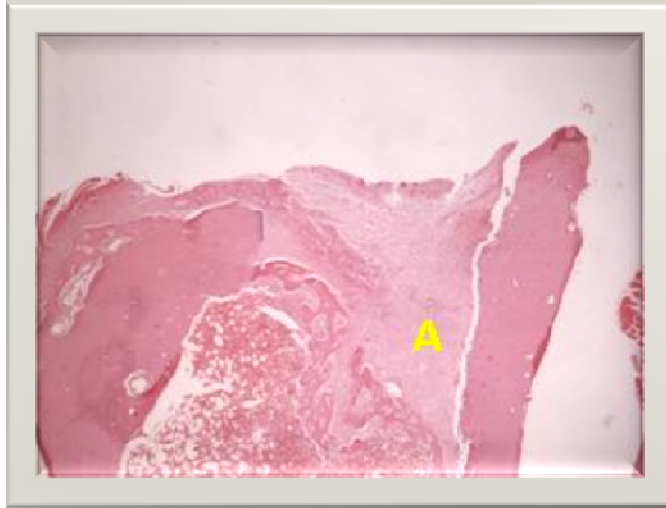


**Figura 27 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 30 dias após terapia.** Coloração com HE. Aumento de 400x.

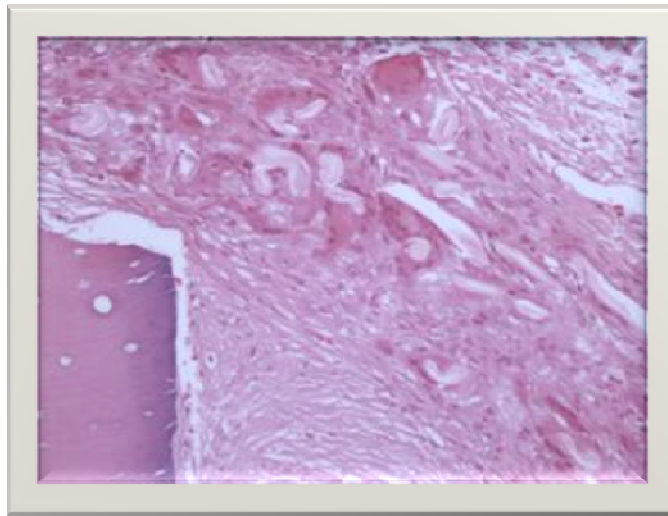


**Figura 28 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 2 no fêmur do rato, 30 dias após terapia.**

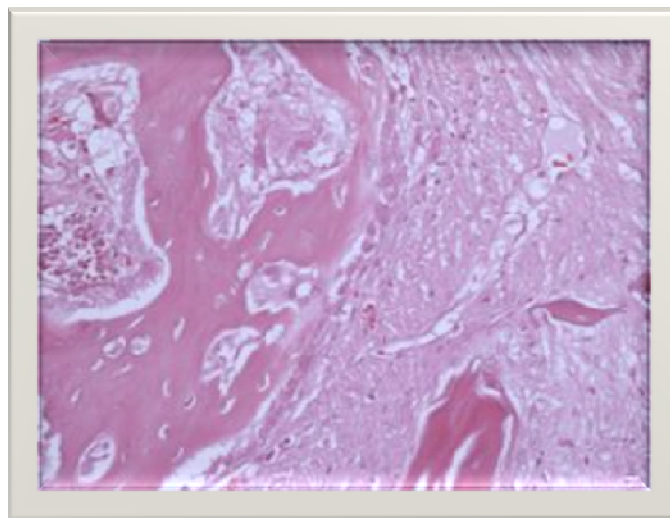
Presença de material exógeno (seta).  
Coloração com HE. Aumento de 400x.



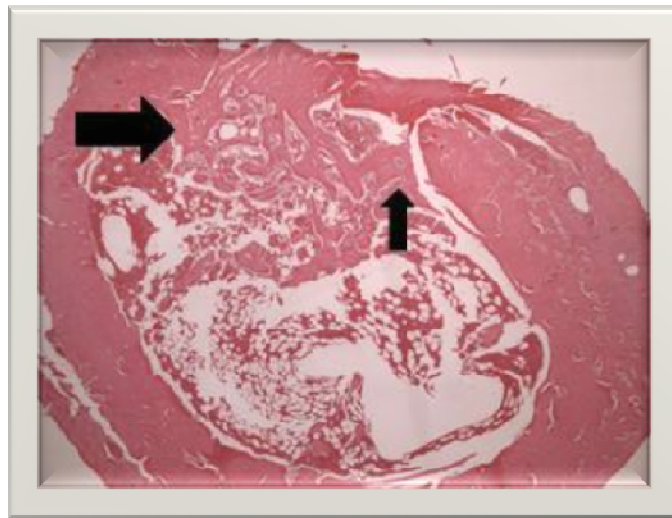
**Figura 29 – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Presença de gel de (A). Coloração com HE. Aumento de 40x.**



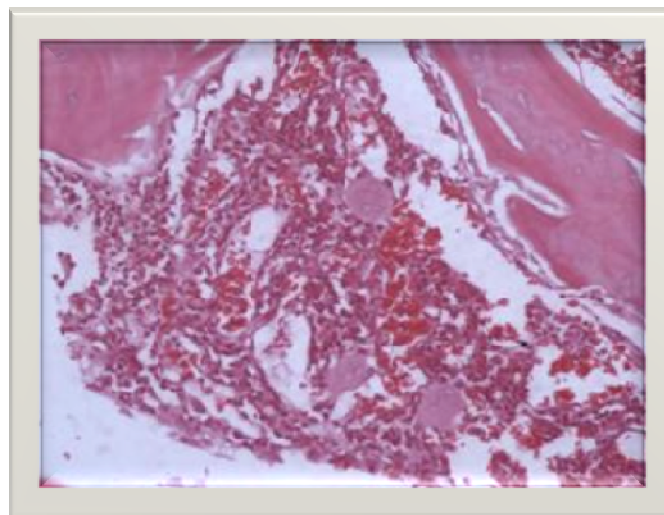
**Figura 30** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.



**Figura 31** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 3 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.



**Figura 32** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Nota-se a corticalização óssea na parte externa do defeito (entre setas). Coloração com HE. Aumento de 40x.



**Figura 33** – Fotografia de um corte histológico transversal da lesão do Grupo 4 no fêmur do rato, 30 dias após terapia. Coloração com HE. Aumento de 400x.

No Quadro 4 é apresentado um resumo das características histológicas observadas nas secções transversais dos reparos ósseos independentemente do tratamento proposto, nos sétimo, 18<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após o procedimento cirúrgico

Comparando os grupos entre os diferentes dias, percebemos que existiu um padrão de reparo ósseo. Nos dias iniciais predominou um quadro de hemorragia com processo inflamatório agudo. Não houve presença de neoformação óssea. Com o passar do tempo esse quadro se alterou para um processo inflamatório crônico. Áreas de neoformação óssea já começaram a ser visualizadas. O tecido conjuntivo fibroso também se mostrou mais estabelecido com o passar do tempo. Ao final de 30 dias percebeu-se uma neoformação óssea em todos os grupos. O gel de HPMC ainda estava presente nesse período. Pouco remanescente da membrana de colágeno foi encontrado nesse estágio (Quadro 4).

---

**Quadro 4. Comparação das características do reparo ósseo nos diferentes dias avaliados através de secções histológicas coradas com HE, independente do tipo de terapia realizado.**

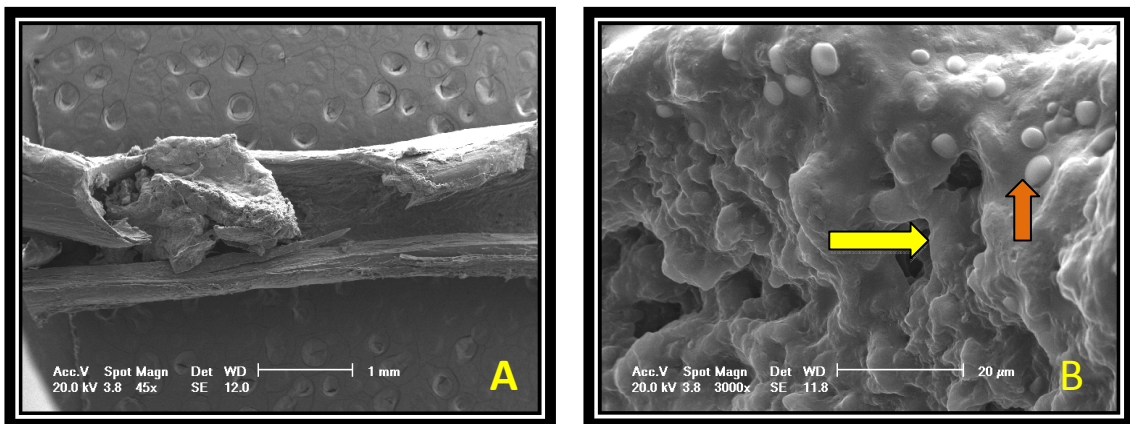
	7 dias	18 dias	30 dias
Defeito Preenchido	1	3	4
Defeito não preenchido	3	1	0
Cortical externa reparada	0	0	1
Tecido conjuntivo fibroso	4	3	4
Hemorragia	4	2	2
Processo inflamatório agudo	4	0	0
Processo inflamatório crônico	0	4	4
Neoformação óssea	0	2	4
Neoformação vascular	0	0	2
Material exógeno	2	1	3
Supuração	1	0	0

Legenda: Os números mostram os valores absolutos, quando se une todos os grupos e compara entre os dias.

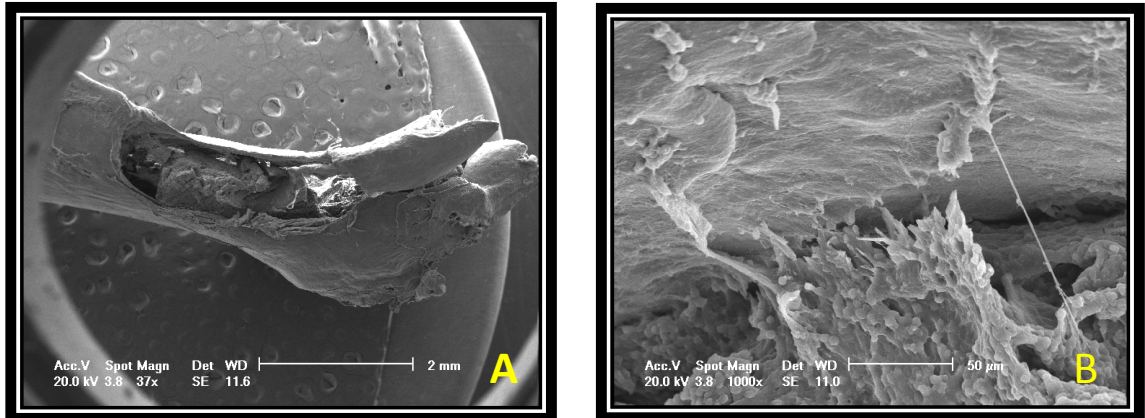
#### 4.2 ANÁLISE DO TRATAMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos dias 7 e 30 de pós-operatório, através de secções transversais dos defeitos ósseos do fêmures dos ratos. Um rato de cada período de avaliação foi utilizado para essa análise. Devido a problemas na aquisição da imagem não foi realizado MEV no 18º dia.

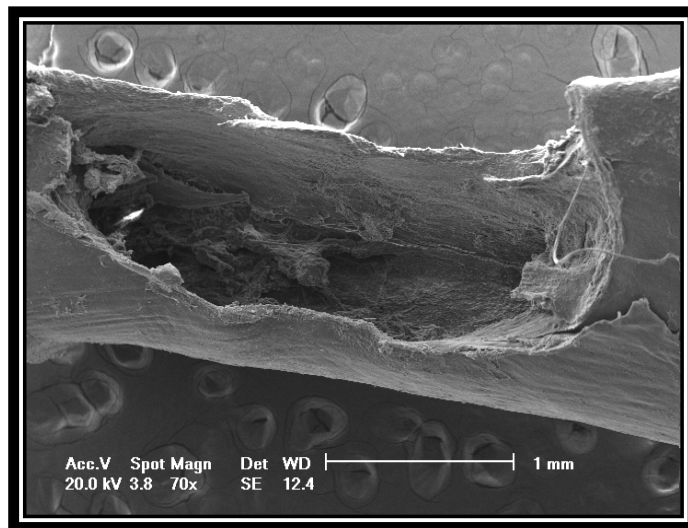
Na avaliação dos defeitos ósseos em 7 dias, não se observou formação óssea. Notou-se uma grande quantidade células inflamatórias. Percebeu-se também a adesão celular à membrana de colágeno (Foto 34). Também pode-se visualizar prolongamentos teciduais na tentativa de se ligar ao osso cortical (Foto 35). O Grupo 3 não apresentou reparo ósseo, provavelmente por um deslocamento do tecido reparador durante o processamento para a realização da MEV, uma vez que macroscopicamente era possível visualizar preenchimento parcial da cavidade (Foto 36). O Grupo Controle apresentou grande quantidade de células inflamatórias, porém com discreto preenchimento da cavidade óssea (Foto 37).



**Figura 34 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 1, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A). Em maior detalhe (B) observa-se a membrana de colágeno (seta amarela) com células aderidas (seta laranja) a ela. 7<sup>o</sup> dia pós operatório.**

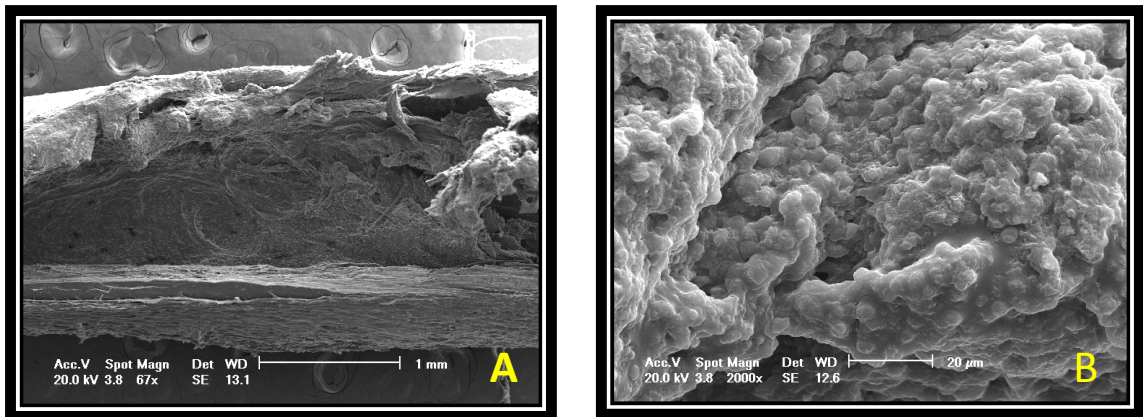


**Figura 35 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 2, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A).** Em maior detalhe observa-se adesão do tecido conjuntivo as paredes ósseas e presença de células inflamatórias (B). 7<sup>o</sup> dia pós operatório.



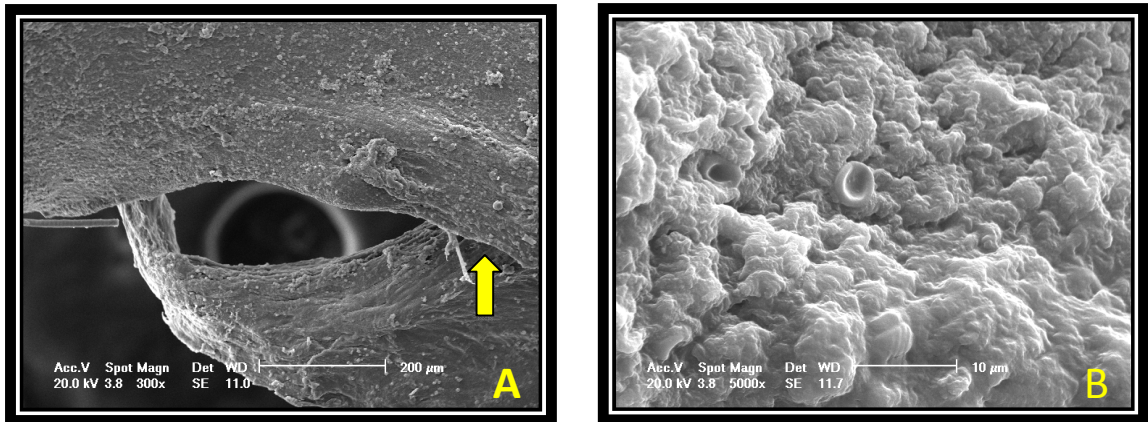
**Figura 36 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 3, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea.** Cavidade óssea vazia, provavelmente por descolamento do tecido cicatricial no momento de confecção da microscopia. Observam-se as irregularidades das paredes do defeito. 7<sup>o</sup> dia pós operatório.



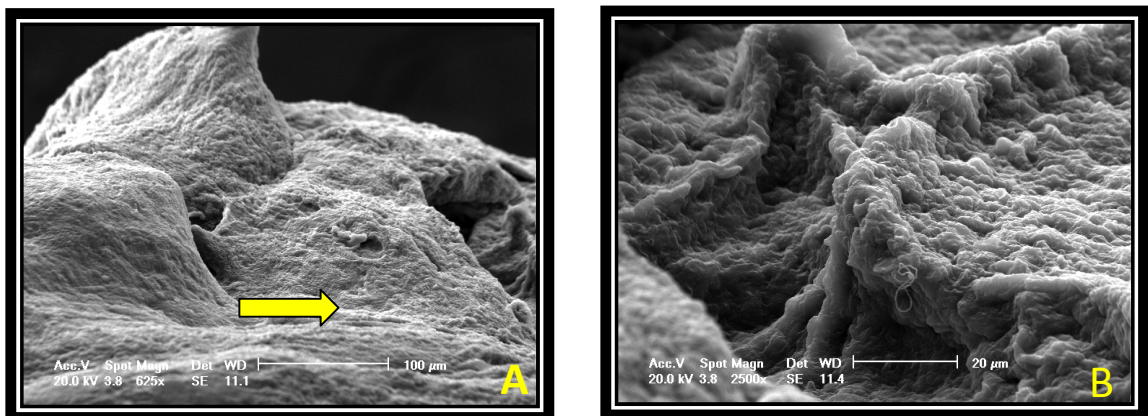


**Figura 37 – Fotografia de um corte avaliado por MEV. Grupo 4, tecido preenchendo parcialmente a cavidade óssea (A).** Em maior detalhe observa-se presença de grande quantidade de células inflamatórias (B). 7<sup>o</sup> dia pós operatório.

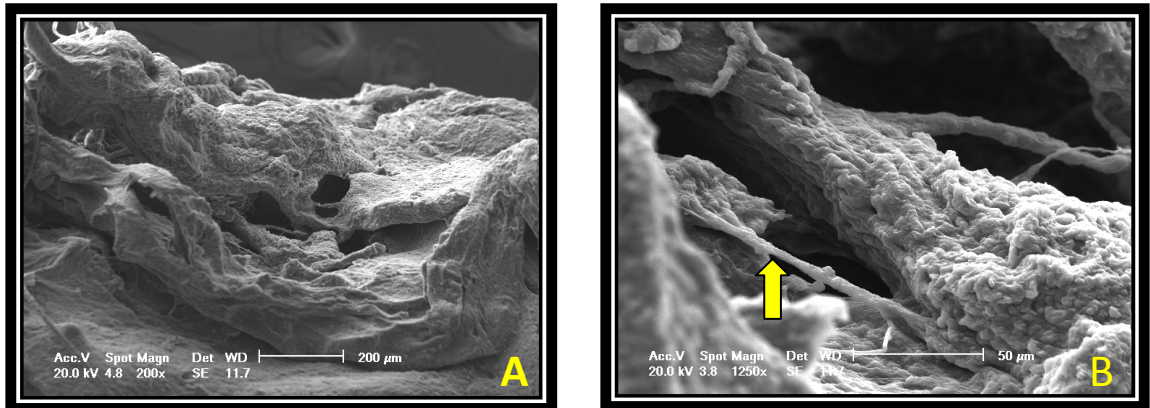
Na avaliação das secções transversais dos defeitos em fêmur dos ratos em 30 dias após a cirurgia e o tratamento através de MEV, percebeu-se uma maior diferenciação do processo de reparo ósseo, com áreas já mimetizando o tecido ósseo. Percebeu-se também a ligação do tecido regenerado ao tecido ósseo preexistente (Foto 38). No Grupo 2 visualizou-se um preenchimento da cavidade óssea com tecido de reparação, ainda sem semelhança ao tecido ósseo (Foto 39). No Grupo 3 observou-se um tecido conjuntivo fibroso, com prolongamentos teciduais de adesão ao tecido ósseo. Percebeu-se que nesse grupo a neoformação óssea ainda não estava estabelecida nas porções mais externas do defeito (Foto 40). O Grupo controle mostrou que já existe a formação de cortical, mimetizando o aspecto do osso adjacente ao defeito ósseo (Foto 41).



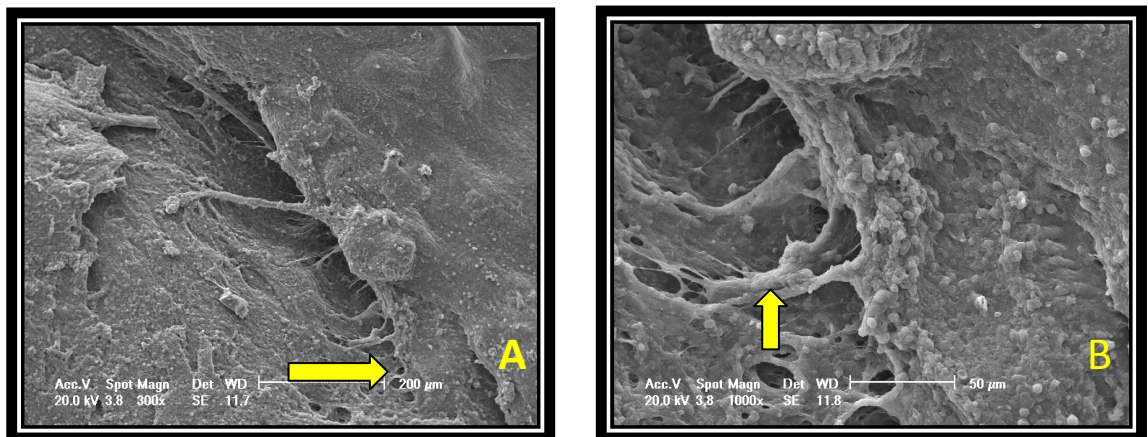
**Figura 38 – Fotografia de um corte avaliado por MEV - Grupo 1.** Percebe-se zonas de quase união entre tecido ósseo e tecido de reparação (A – seta). Em maior detalhe observa-se tecido fibroso que compõe grande parte do tecido de cicatrização (B). 30<sup>o</sup> dia pós operatório.



**Figura 39 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV - Grupo 2.** Percebe-se zonas de quase união entre tecido ósseo e tecido de reparação (A – seta). Em maior detalhe observa-se tecido fibroso que compõe grande parte do tecido de cicatrização (B). 30<sup>o</sup> dia pós operatório.



**Figura 40 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV - Grupo 3.** Tecido de reparação disposto por toda a cavidade, com íntima relação com as paredes do defeito (A). Em maior detalhe observa-se a união entre diferentes partes do tecido de reparação (B – seta). 30<sup>o</sup> dia pós operatório.



**Figura 41 – Fotografia de um corte transversal avaliado por MEV – Grupo 4.** Percebe-se zonas de quase união entre tecido ósseo e tecido de reparação (A - seta), mimetizando tecido ósseo. Em maior detalhe observa-se a ligação entre os tecidos (B - seta). 30<sup>o</sup> dia pós operatório.

---

## **5 DISCUSSÃO**

---

## **5 DISCUSSÃO**

A forma de reabilitação pós extração dentária gera grande interesse da área acadêmica. Os benefícios de acelerar o reparo ósseo, para que o paciente possa ter a reabilitação estética e funcional com o menor período de tempo possível tem sido muito estudado. Isso pode ser determinante para as diferentes técnicas de reabilitação com implantes dentários.

O processo natural do reparo ósseo é suficiente para restaurar eficazmente a maioria dos defeitos ósseos<sup>2</sup>. O processo de reparo ósseo alveolar abrange diferentes etapas, e se caracteriza por ser um processo relativamente lento. Enquanto a cicatrização epitelial leva em torno de 7 dias, a completa consolidação óssea em humanos pode levar até 3 meses. Esse tempo gera ao paciente diversos transtornos sociais. A aceleração do processo deve ser uma preocupação constante nas pesquisas científicas.

Diversos parâmetros são utilizados quando se avalia o sucesso no reparo do alvéolo dentário que será reabilitado com implantes. A qualidade do osso formado é importante, porém sua espessura e a relação com os tecidos moles (gengiva) também são fundamentais. Quando se compara a reabilitação estética e funcional após a extração dentária, observa-se que não existem diferenças estatísticas entre técnicas que reabilitam imediatamente com

---

implantes e outras que esperam a consolidação do alvéolo para essa reabilitação. Entretanto em nenhuma das técnicas o resultado é plenamente satisfatório. Cabe ressaltar que nem todos os casos permitem uma reabilitação com implantes imediatamente, pois o tamanho do alvéolo, após a extração dentária pode ser superior ao diâmetro do implante<sup>21</sup>. Nesses casos há a necessidade de aguardar três meses para realizar a reabilitação.

De forma a entender como os biomateriais se comportam quando utilizados para regeneração óssea, o comportamento histológico deve ser estudado. Isso dificulta a pesquisa clínica em humanos devido a necessidade de remoção de osso em um momento tardio, podendo este dano gerar um prejuízo irreparável ao paciente. Por essa razão, os modelos experimentais com animais são utilizados. Dessa forma, tenta-se criar defeitos ósseos que mimetizem o que ocorreria nos humanos.

Os defeitos a serem regenerados em animais também são controversos. A complexidade de tratamento e manutenção de animais de grande porte, faz com que se opte por animais menores. O uso de ratos em pesquisa parece ser positivo em estudos a curto prazo<sup>7</sup>. Porém, esses tem a desvantagem de apresentar estruturas ósseas pequenas. A procura pela melhor metodologia é frequente e controversa, pois quando comparado o reparo espontâneo de defeitos críticos em ratos jovens e adultos, que apresentavam 3, 4 e 5 milímetros de diâmetro em osso parietal, observou-se que em ratos adultos, com 60 dias de vida houve falhas no reparo ósseo, o que não ocorreu em ratos jovens<sup>4</sup>.

---

Nesse estudo podemos observar três momentos distintos do reparo ósseo em fêmur de ratos, onde verificou-se a diferença da fase de cicatrização nos diferentes períodos de tempo.

Inicialmente houve uma grande presença de tecido inflamatório agudo, com predominância de neutrófilos. Em duas semanas, ocorreu uma alteração do padrão celular, agora com predominância de linfócitos e plasmócitos, caracterizando um processo inflamatório crônico. Porém, ao final de 30 dias, poucas células inflamatórias foram encontradas, e quando presentes ocorreram nos grupos com presença de biomaterial. Nesses grupos é possível ainda observar que há presença de macrófagos e células gigantes no entorno dos biomateriais, mesmo nos períodos mais tardios do estudo. Fato esse que não ocorreu no grupo controle.

Embora Panetta e colaboradores tenham relatado que ratos adultos possam apresentar falhas no reparo ósseo em defeitos de três milímetros, todos os defeitos realizados nos ratos nesse estudo apresentaram um comportamento normal. Ainda que em 30 dias a calcificação não estivesse completa, todos grupos apresentavam preenchimento da cavidade óssea com tecido de reparação<sup>4</sup>.

Existe uma particularidade na cicatrização alveolar, que dificulta a reprodução do defeito em animais de pequeno porte. O alvéolo, após a extração dentária, se torna um ferimento exposto, onde o osso não consegue

---

ser recoberto por tecido epitelial por um processo de cicatrização de primeira intenção. Esse fato faz com que a cicatrização óssea comece pelas partes mais internas do alvéolo e, com o tempo, vá em direção as partes mais externas da cavidade óssea. No modelo criado no fêmur de ratos, pode-se perceber um processo de reparo ósseo semelhante. Observou-se que a formação óssea iniciou-se no seu interior e nas margens da cavidade. Com o passar do tempo, ocorreu o preenchimento da cavidade e uma migração para as áreas mais externas do defeito ósseo.

A medula óssea de ratos adultos é um excelente fonte de células-tronco adultas. Essas células podem se diferenciar em células de linhagem osteogênica, se assim forem induzidas<sup>22</sup>.

Embora existam células pluripotentes no osso receptor, dependendo do tipo de defeito ocorrido, é interessante a adição de células-tronco adultas para aumentar o potencial de sucesso e melhorar a qualidade do osso restaurado<sup>23</sup>. Essa afirmação não é verdadeira quando tratamos de defeitos não críticos

A adição de CMMO em reparo ósseo de lesões não críticas parece não influir no processo de reparo. Essas células quando expostas ao meio, receberão os estímulos naturais do meio para se diferenciarem em células do próprio tecido a ser reparado. Porém essa diferenciação não parece ser necessária, uma vez que o reparo vai ocorrer normalmente. Ao se criar o defeito ósseo, ocorre a geração de um processo inflamatório que terá como objetivo o reparo completo da lesão. Não havendo impeditivo mecânico ou

---



sistêmico, esse processo irá ocorrer sem que se faça necessário o auxílio de outra técnica de reparação.

As CMMO para serem bem sucedidas no reparo ósseo devem apresentar a capacidade de regenerar um novo osso maduro e funcionalmente competente. Além disso devem ter a propriedade de permitir a proliferação do tecido, ser de fácil obtenção, sem que isso gere uma nova seqüela ao paciente<sup>4</sup>. No caso da regeneração de defeitos ósseos não críticos, o uso das CMMO parece não cumprir esses requisitos, pois seu benefício não é superior ao trauma realizado para sua obtenção.

Um arcabouço ideal deve apresentar algumas características fundamentais: ser de fácil adaptação ao osso; permitir a adesão, crescimento e maturação das CMMO; ser uma barreira ao tecidos vizinhos; e ser absorvida em um tempo compatível com a formação óssea, porém sem que isso interfira nessas etapas<sup>22</sup>.

Ao avaliar a capacidade de diferenciação de CMMO de ratos sobre membranas de colágeno *in vitro*, Donzelli observou que membranas reabsorveram em até 4 semanas. Nesse período, a função de barreira pode ser ainda importante, pois ainda não há uma completa cicatrização do defeito ósseo<sup>22</sup>. Após 21 dias de cultura *in vitro* não houve influência negativa da membrana de colágeno em relação a proliferação e diferenciação das CMIs.

Os resultados de experimentos *in vitro* incrementam o desenvolvimento de modelos *in vivo* e exploram a relação entre as propriedades dos materiais de

---

implante e suas respostas biológicas<sup>24</sup>. O presente estudo segue uma linha de pesquisa que associa a biologia molecular e celular, tentando evidenciar o potencial clínico do uso de técnicas variadas para a regeneração óssea. A capacidade de adesão da célula mesenquimal à membrana de colágeno é uma realidade<sup>16</sup>. Busca-se extrapolar essa característica para melhorar a qualidade e velocidade do reparo ósseo.

Biomateriais também vem sendo estudados como forma de arcabouço para transplantes celulares. A célula uma vez depositada em um sítio, deve ser mantida nesse local para que possa sofrer as influências do meio e poder se diferenciar e multiplicar<sup>15</sup>. Diversos materiais e diversas formas de aplicação tem sido testado, sendo que o uso do gel de HPMC parece ser um veículo inerte e que não gera transtornos nem para o local receptor nem para a célula transplantada. Nesse estudo tanto o uso de soro fisiológico como o uso do gel de HPMC não influenciaram negativamente o processo de reparo tecidual.

O HPMC tem excelente propriedades para aplicações em farmacologia e como aditivo alimentar e é fisiologicamente inerte. Porém sua biodegradabilidade varia de lenta a muito lenta<sup>25</sup>. Esse fato explica a presença de células inflamatórias nos grupos nos quais foi acrescentado este gel. Observou-se que esse biomaterial tem uma absorção lenta pelo organismo. Ao final de 30 dias havia, ainda, diversas áreas onde o material estava presente.

Outros biomateriais, quando utilizados na regeneração óssea, apresentam um processo inflamatório intenso na tentativa de sua reabsorção.

---

Em um estudo com enxertia de grânulos de fosfato tricálcico foi observado, na maioria dos animais, um processo inflamatório, com grande quantidade de neutrófilos e células gigantes multinucleadas associadas ao biomaterial, tanto aos 7 como aos 21 dias após tratamento<sup>26</sup>.

Chou e colaboradores induziram a diferenciação de células-tronco da medula óssea humana cultivadas sobre uma membrana não-absorvível (poliestireno), evidenciando a regulação da osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea. Relataram que o fato de utilizar uma membrana não absorvível teria como desvantagem a necessidade de sua remoção posterior. Entretanto, o uso de uma membrana absorvível pode liberar subprodutos de sua decomposição que seriam problemáticos, porque a diferenciação celular pode necessitar de vários dias de ausência de fatores externos. Portanto, esses fatores poderiam alterar o pH local ou mesmo o metabolismo e comportamento celular<sup>27</sup>. Para Sung e colaboradores, a degradação do suporte de PLGA alterou o pH normal e acabou afetando também a viabilidade celular após 28 dias em cultura. Porém, não foi possível afirmar que modelos bi-dimensionais teriam o mesmo comportamento que os modelos tri-dimensionais<sup>28</sup>. Esses fatos podem alterar o comportamento do reparo ósseo nos momentos iniciais, como foi observado nesse estudo, quando observou-se a presença de células inflamatórias no entorno dos biomateriais, mesmo 30 dias após sua implantação.

No presente estudo observou-se a reabsorção quase total das membranas de colágeno em 30 dias após o procedimento. Percebeu-se

---

também, remanescentes de HPMC no interior do osso. Esse processo de reabsorção não parece interferir diretamente na cicatrização óssea. Entretanto, o fato de somente o grupo controle apresentar osso cortical da parte externa do defeito após 30 dias, sugere que o organismo possa dispende mais tempo com o processo inflamatório para reabsorver o biomaterial, ao invés de formar e consolidar o osso.

---

---

## **6 CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

Avaliando e comparando a influência de células mononucleares de medula óssea (CMMO) no reparo de defeitos ósseos em fêmur de ratos foi possível concluir que:

- o uso das CMMO no período estudado não interferiu o processo de reparo ósseo;
- no modelo de defeito ósseo proposto o uso das CMMO não alterou a qualidade do reparo ósseo;
- todos os grupo reestabeleceram o volume ósseo inicial, porém somente o grupo controle apresentou osso cortical formado ao final de 30 dias;
- o uso de biomateriais atrasou o processo de reparo ósseo, sendo que nos grupo em que havia gel hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), não houve formação de tecido ósseo na porção mais externa do defeito ósseo no período estudado.

O uso de biomateriais atrasa o processo de reparo ósseo, uma vez que o organismo tem que reabsorver esse biomaterial, ao mesmo tempo em que realiza a neoformação óssea.

---

---

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Embora o presente estudo não tenha mostrado vantagens no uso de células mononucleares da medula óssea (CMMO) no reparo de defeitos ósseos, mais estudos sobre esse tópico devem ser realizados. A utilização de substâncias osteopromotoras, como o Plasma Rico em Plaquetas deve ser testado juntamente com as CMMO, com o intuito de acelerar o processo de reparo.

O uso do HPMC não deve ser descartado, pois o seu efeito a longo prazo e em defeitos ósseos maiores ainda não são explicados.

Períodos maiores de avaliação devem ser estudados.

---



---

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATTAWIA M, KADIYALA S, FITZGERALD K, e colaboradores. Cell-based approaches for bone graft substitutes, in Laurecin CT (ed): Bone Graft Substitutes. West Conshohocken, PA, ASTM International pp 126-141, 2003.
  2. KRAUS KH, KIRKER-HEAD C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Vet Surg.** 2006;35:232-242.
  3. FLEMING JE, CORNELL CN, MUSCHLER GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. **Orthop Clin North Am.** 2000;31:357-374.
  4. PANETTA NJ, GUPTA DM, QUARTO N, LONGAKER MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. **Panminerva Med.** 2009;51:25-41.
  5. VILQUIN, J.T; ROSSET, P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. **Regen Med.** 2006 Jul;1(4):589-604.
  6. JAGER, M., et al. Bone Healing and Migration of Cord Blood derived Stem Cells into a Critical Size Femoral Defect after Xenotransplantation. **J Bone Miner Res.** 2007 Apr.
-

- 
7. BREVINI, TA et al. Porcine embryonic stem cells: facts, challenges and hopes. **Theriogenology**. 2007;68:206-13.
  8. ZOU, L; LV, L; FENG, W. Characteristics of osteoblastic differentiation in mesenchymal stem cells from porcine bone marrow in vitro. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**. 2007 Nov;21(11):1222-7.
  9. LEE, KB et al. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects – a porcine model. **Stem cells**. 2007;25(11):2964-71.
  10. ABUKAWA, H et al. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. **J Oral Maxillofac Surg**. 2004; 62(5):601-6.
  11. NAGATA M, MESSORA M, OKAMOTO R, CAMPOS N, POLA N, ESPER L, SBRANA M, FUCINI S, GARCIA V, BOSCO A. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**. 2009 Aug;45(2)339-45.
  12. BABA S, INOUE T, HASHIMOTO Y, KIMURA D, UEDA M, SAKAI K, MATSUMOTO N, HIWA C, ADACHI T and HOJO M. Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration — Assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. **Dent Mater J**. 2010;29(6):673–68.
  13. GUSKUMA MH; VIEIRA EH; PEREIRA FP; GARCIA IRJ; OKAMOTO R; OKAMOTO T; MAGRO OF. Bone regeneration in surgically created
-

- defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. **J Appl Oral Sci.** 2010 July/Aug;18(4)
- 14.GRANERO-MOLTÓ F, WEIS JA, MIGA MI, e colaboradores. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells.** 2009;27:1887-1898.
- 15.CHAN BP, HUI TY, YEUNG CW, LI J, MO I, CHAN GCF. Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. **Biomaterials.** 2007;28:4652-4666.
- 16.FRITSCHER GG. Cultivo de células da medula óssea humana sobre membranas de colágeno bovino e arcabouços de ácido poliglicólico polilático (PLGA). **Dissertação de Mestrado.** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 121p, Porto Alegre, 2007.
- 17.CAIAZZA, S. et al. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. **Implant Dent.** 2000;9(3):219-25.
- 18.TAL H., et al. Guided periodontal regeneration using bilayered collagen membranes and bovine bone mineral in fenestration defects in the canine. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 2005 Oct;25(5):509-18.
- 19.OZMERIÇ N. et al. The effect of a collagen membrane in regenerative therapy of a two-wall intrabony defects in dogs. **Periodontal Clin Invest.** 2000;22(1):22-30.
- 20.SCULEAN A. et al. Healing of intra-bony defects following treatment with a composite bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination
-

- 
- with a collagen membrane (Bio-Gide). **J Clin Periodontol.** 2005 Jul;32(7):720-4.
21. STAFFORD GL. Are the outcomes of immediate and early single tooth implants comparable to conventionally placed implants? **Evid Based Dent.** 2009;10(3):77-8.
22. DONZELLI E et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. **Arch oral biol.** 2007;52:64–73.
23. BOYNE PJ. **Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible.** 1ed, Estados Unidos, Quintessence, 1997.
24. KELLER, J. C. et al. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. **Implant Dent,** 2003;12(2).
25. ROHR TG. Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, 95p, Seropédica, 2007.
26. YASSUDA-MATTOS DH. Estudo do reparo ósseo em alvéolo dentário de ratos após implantação de grânulos porosos de  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -tcp) e de  $\beta$ -tcp contendo magnésio ( $\beta$ -tcmp). **Anais do 6º COLAOB.** 2010.
27. CHOU et al. In vitro response of MC3T3-E1 preosteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. **J Biomed Mater Res Part B: Appl. Biomater.** 2005;75:81-90.
-

28. SUNG H.J. et al. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials**. 2004;25:5735-42.
-

---

**ANEXOS**

---

---

**Bone marrow stem cells and biomaterial influence in bone repair in rats**

Fritscher, Guilherme G<sup>1</sup>; Marinowic, Daniel R<sup>2</sup>; Hildebrand, Laura C<sup>4</sup> and Machado, Denise C<sup>2,3</sup>.

Affiliation:

<sup>1</sup>Post Graduation Program in Medicine and Health Science and Dentistry School; <sup>2</sup>Biomedical Research Institute; <sup>3</sup>Medical School, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Post Graduation Program in Oral Pathology – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

Corresponding author: Guilherme G Fritscher

Corresponding address: Av. Ipiranga 6681, Prédio 6, 2º Andar, Faculdade de Odontologia – PUCRS, CEP: 90610-000, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [guilherme.fritscher@pucrs.br](mailto:guilherme.fritscher@pucrs.br)

---



**Abstract**

Bone defect may be considered critical or not. In many cases, the organism will repair the bone loss normally, without leaving any sequels. But even then, the time it takes to repair, will bring some temporary sequel to the patient. This study aimed to evaluate and compare the influence of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) diluted in saline or hydroxypropil methylcellulose (HPMC) associated or not with collagen membrane to repair femur defects in rats. Eleven Kyoto male rats were used. Two animals were bone marrow donors and nine belong to experimental groups. The animals were subjected to four tissue damage in the right femur and in each defect received the following treatment: Group 1: BMMCs diluted with normal saline covered with collagen membrane; Group 2: BMMCs diluted with 2% of HPMC; Group 3: BMMCs diluted with 2% of HPMC covered with a collagen membrane; and Group 4: control group, spontaneous repair. Four animals were euthanized at 7, 18 and 30 days after bone defect and treatment. The femurs were evaluated by conventional histology by hematoxilin and eosin staining and by scanning electron microscopy. The data obtained suggests that the use of bone marrow mononuclear cells do not contribute to accelerate the process of bone repair in not critical defects. Only control group had cortical bone formation in its outer portion. The use of biomaterials may also delay the process of bone repair, since the body will have to absorb this biomaterial, instead of forming new bone.

**Keywords:** Bone regeneration; biomaterials, HPMC, collagen, bone marrow mononuclear cells.

---

## **1. Introduction**

The advances in technology and new techniques have made major contribution to assist not only the diagnosis, but also influence the treatment and better prognosis in clinical and surgical practice.

The bone defects can be considered critical or not. In many cases, the body will not faithfully repair bone loss, due to critical defects, so it will bring irreparable functional and/or aesthetic loss. However, in some cases the organism will normally repair the defect without leaving any sequels, but even then, the time that it will take to repair the bone defect, will still bring some temporary sequel to the patient.

Various therapies, either with autogenous bone grafts or allografts, as well as biomaterials (bovine bone, collagen membranes, and membranes of polylactic acid and polyglycolic acid and titanium implants) have been evaluated. Evidence shows its advantages; however, we must be prepared for their failures.

The bone can be regenerated by osteogenesis, osteoinduction, osteoconductive or osteopromotion, and the ideal would be if all of them act together, although osteogenesis is considered the gold standard. The osteogenesis occurs through the transplantation of autogenous bone cells while osteoinduction will happen where any bone would be formed. These materials do not work alone. They recruit undifferentiated mesenchymal cells, which are then stimulated to differentiate into osteoblastic cells. An example would be the bone morphogenetic protein and demineralized bone matrix<sup>1</sup>.

Osteoconductive materials have the property to recruit and maintain a framework to enable the migration of bone cells or undifferentiated mesenchymal stem cells towards the defect, contributing to new bone formation. Another important reason of

---

maintaining these osteoconductive materials came from its ability to prevent the epithelium migration into the defect, since the bone repair is time consuming and, therefore, it could lead to a loss of bone volume<sup>2</sup>. Among these materials we can include hydroxyapatite, calcium sulfate and collagen membrane<sup>3</sup>.

The defects to be regenerated in animals are also controversial. A comparison of spontaneous repair of critical defects with 3, 4 and 5 mm in diameter, in parietal bone shown problems in bone repair in adult rats, but did not occurred in young rats<sup>4</sup>.

One of the main difficulties in stem cell therapy is the route of cell deliver at the site of injure. It has been observed that the stability of these cells within the lesion is fundamental for the success of this therapy. Structures of collagen are among the vehicles capable of transporting the stem cell, because its structural features that allow cellular adhesion<sup>5,6</sup>.

Once the mechanisms that involve differentiation of precursor cells into several cell types are known, surgical procedures to treat a variety of pathologies related to tissue neoformation and remodeling would be favored by a shortened period of healing and will result in a more successful surgical interventions.

This study evaluate the early bone healing in rat femurs, within 30 days, in order to verify whether it is possible to shorten the process of bone repair by the use of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) diluted in saline or hydroxypropil methylcellulose (HPMC) implantation associated or not with collagen membrane.

---

## **2. Animals and Methods**

### **2.1 Ethics**

This study was carried out after full approval by the Scientific Committee of the Post Graduate Program in Medical and Health Sciences and by the Ethics Committee for Animal Use at PUCRS, and followed the Guide to Care and Use of Laboratory Animals of National Institutes of Health (USA) adopted by the Brazilian Council for Animal Experimentation (COBEA).

### **2.2 Animals**

Eleven Kyoto male rats were used and maintained in a ventilated cage rack system facility with HEPA filter hood with reverse light cycle and controlled temperature, with a diet *ad libitum*, and after surgery were kept in isolated cages in the same ventilated cage rack.

Two animals were bone marrow donors, twelve were subjected to four tissue damage in the right femur, and the following treatment was used in each defect: Group 1: BMBCs diluted with normal saline covered with collagen membrane; Group 2: BMBCs diluted with 2% of hydroxypropil methylcellulose (HPMC); Group 3: BMBCs diluted with 2% HPMC covered with a collagen membrane; and Group 4: control group, spontaneous repair (Figura 1b).

### **2.3 Bone marrow mononuclear cells isolation**

Isolation of BMBC was performed, after a lethal intra-peritoneal dose of 0.4 to 0.6 ml of a solution containing 0.8% ketamine and 0.2% chlorpromazine according to animal weight. Tibias and femurs were dissected out. The marrow was extruded with 1 ml of DPBS (Gibco™, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) with a 0.8x25 mm needle.

---

BMMC were washed twice with 1 ml of DPBS by centrifugation for 30 seconds at 700 g. The bone marrow cells were resuspended with 2 ml of culture medium D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media; Invitrogen, USA), placed over 2 ml of Histopaque®-1119 and centrifuged (MSE Mistral 2000, USA) at 400 g for 30 minutes. The mononuclear cell layer was removed and washed with 10 ml of DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, Invitrogen, USA) and centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes. The quantification and cell viability were assessed using the trypan blue dye exclusion. The cells were resuspended with DPBS or with 1% of HPMC in DPBS at a density of  $10^5$  cells/ml.

#### **2.4 Surgical Procedures**

The animals were operated in a special room of the Laboratory of Medical Abilities, Medical School of PUCRS, Brazil. The rats underwent general anesthesia with intramuscular injection of hydrochloride Di-hydro-thiazine (Ropum®) and ketamine (Dopalem®) diluted in a concentration of 1:1 and a dose of 0.1 ml/100 g weight. After induction, the animals were positioned prone and trichotomy was performed from left hindlimb of each rat with a razor blade mounted and held in place with the antiseptic chlorhexidine gluconate 2%. The incision was made with a scalpel blade n°15, divulsion in plans. The integrity of the periosteum detachment was preserved otherwise the animal was excluded from the experiment.

Four bi-cortical bone cavities of  $3 \text{ mm}^2$  with a n° 2 round bur (Carbide ®) at 20,000 rpm under constant irrigation of saline 0.9% (Figure 1a) were performed and treated according to the experimental groups described above. The suture was performed with wire monofilament nylon 4-0.

---

All rats received postoperative analgesia with Paracetamol 200 mg/kg intramuscularly for two days.

### **2.5 Femur collection and preparation to evaluate the bone repair**

The animals were euthanized with a lethal intra-peritoneal dose of ketamine and chlorpromazine, as described above, seven, 18 and 30 days after surgical procedure. The left femur of each animal was resected and stored in formalin 10% followed by decalcification with nitric acid and paraffin inclusion. Histological slices were stained with hematoxylin/eosin (HE), and were analyzed with direct light microscope.

### **2.6 Scanning electron microscopy of bone repair**

The bone repair surfaces were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) at 20.0 kW of one rat from each group seven and 30 days after surgery and treatment.

## **3. Results**

Seven days after surgery it was observed an acute inflammation, hemorrhage, and fibrous connective tissue (Table 1). New bone formation was not observed at that stage. The group containing HPMC gel and collagen membrane showed suppuration. The collagen membrane delimited the repair process (Figure 1).

A chronic inflammatory pattern and the presence of fibrous tissue in all groups were detected after 18 days. Bone formation was observed, but without neovascularization. The femur from rats that received only BMMCs and HPMC showed a slower healing process than the other groups (Table 2 and Figure 2).

Thirty days later, all the defects were filled with bone tissue (Table 3). Group 2 had the worse bone healing. There was also a presence of the HPMC gel that period. In

---

this phase all groups showed new bone formation, although only the control group showed bone cortical layer at the outer part of the defect (Figure 3).

Comparing the different groups within days, it was observed that there was a pattern in bone healing. Few days after procedure a hemorrhage and acute inflammatory process predominate; there was no new bone formation. With the time, this was replaced by a chronic inflammatory process. Areas of bone formation and connective tissue were present. At the end of 30 days there was new bone formation in all groups. HPMC gel was still present in this period. Somewhat reminiscent of collagen membrane was found at this stage (Table 4).

The scanning electron microscopy was performed on days 7 and 30 post-operatively, through cross sections of bone defects. One rat of each assessment period was used for this analysis.

Seven days after surgery there was no bone formation but various inflammatory cells. It was also detected cellular adhesion to collagen membrane, and tissue extensions in an attempt connect to the cortical bone. The control group showed a great amount of inflammatory cells, but with slight bone cavity filling (Figure 4).

Within 30 days there was an outstanding differentiation of bone repair process, with areas already mimicking bone tissue. It was also seen the union of the regenerated tissue to preexisting bone. Femurs treated with BMSCs and HPMC alone (Group 2) had bone cavity filled with repair tissue, but still no resemblance to bone. Femurs from animals belonging to Group 3 did not show new bone formation was in the outer portions of the defect. The control group showed cortical bone formation mimicking such as bone adjacent to the defect (Figure 5).

---

## 5. Discussion

The rehabilitation after tooth extraction generates great interest in academia. The benefits to accelerate bone repair aiming to improve patient's aesthetic and functional rehabilitation in a shorter time have been extensively investigated and the outcome could have an important contribution to rehabilitation techniques with dental implants.

The natural process of bone repair is sufficient to efficiently restore most of the defects<sup>1</sup>. The process of alveolar bone repair includes different stages, and is characterized by a relatively slow process. While the epithelial healing takes about seven days, complete bone healing in humans can take up to three months causing several social disruptions to patients.

Several parameters are used when evaluating the repair success of dental sockets that will be rehabilitated with implants. The quality of the new bone is important, but its thickness and its relationship with the soft tissue (gum) are also fundamental. There are no differences between techniques immediately rehabilitated with implants when compared with others that await the alveoli consolidation before the rehabilitation after tooth extraction. However, none of these techniques give satisfactory results. Indeed, not all cases of tooth extraction allow an immediate implant reconstruction, since the size of the alveolus may be bigger than the implant diameter<sup>7</sup>. In such cases the rehabilitation will be possible only after three months.

A constant concern in scientific research should be to improve and speed the process of bone healing and several researches have been focus on the determination of the best technique and materials in experimental models. The use of mice and rats as experimental models seems to be positive for a short-term studies but it is not suitable

---



for a medium and long term follow-up, since these animals lifetime shortens the evaluation period. Moreover, the recent advances on stem cell therapy and biomaterials brought new perspectives to clinical and surgical treatments. The concept of using stem cells in tissue repair has gradually evolved and the goal of this therapy is to improve the ability to replace or repair the bone defects, when there is a partial or complete failure during the normal tissue repair.

In this study we evaluated and compared the bone healing in rat femur on three different periods, and found that, initially, there is a large acute inflammatory tissue, predominantly with neutrophils. After two weeks, there is a predominance of lymphocytes and plasma cells that characterizes a chronic inflammatory process. However, after 30 days, a few inflammatory cells are left mainly where the biomaterial was used. Macrophages and giant cells were still present around the vicinity of biomaterials up to the later periods of the evaluation, which did not occur in the control group.

While Panetta et al. has reported that adult rats may fail to repair bone defects of 3 mm, all defects conducted in this study had a normal behavior<sup>4</sup>. Although calcification in 30 days was not completed was possible to observe, in all experimental groups, a filling of bone cavity with repaired tissue<sup>4</sup>.

There is a peculiarity in the alveolar healing, which hampers the reproduction of the defect in small animals. The alveolus after tooth extraction becomes an exposed wound where the bone cannot be covered by epithelial tissue by first intention healing. This fact makes the bone healing begin with the inner parts of the socket and, with time, go toward the outer parts of the bone cavity. In the model created in rat femurs, one can

---

see a similar process of bone repair. It is observed that bone formation starts inside and goes towards the edges of the cavity. The filling of cavity and a migration to the outer areas of the bone defect will, eventually happen.

The addition of stem cell in bone repair of non-critical injuries does not seem to affect the repair process, since it will occur normally. When creating a defect, an inflammatory process starts, and if there is no mechanical impediment or other systemic process, the healing will occur without further manipulation. However, some biomaterials (scaffolds) associated with adult stem cells could improve the outcome. An ideal scaffold should be easy adapted to the bone, and to allow the adhesion, growth and maturation of stem cells. Moreover, it will be a barrier to surrounding tissues, and absorbed in a time compatible with bone formation, without interfering in the bone repair stages<sup>8</sup>. The collagen membrane is a natural absorbable material (biomaterial) used to guide bone regeneration, and provide a mechanical barrier to allow bone healing, preventing fibroblasts interference. Moreover, collagen membranes do not require additional surgery to remove since its absorption time is modulated by chemical agents<sup>9</sup>. Analyzing the adherence of adult stem cells over collagen membranes, *in vitro*, Fritscher noted that these cells not only adhere to these membranes, but also can proliferate and differentiate, when stimulated with bone morphogenetic protein and/or platelet rich plasma<sup>6</sup>. The cells over collagen membranes form a complex with osteogenic capacity, allowing the deposition of calcium phosphate and alkaline phosphatase in their spheres, besides allowing the osteoinductive activity, through the differentiation of stem cells into osteogenic lineage<sup>5</sup>.

---

When evaluating the ability of rats stem cells differentiation over collagen membranes *in vitro*, Donzelli et al., noted that membranes absorption occurred within 4 weeks, a length of time when the presence of the barrier may still be important, since bone healing is not complete. Moreover the authors also pointed that even after 21 days of culture there is no influence of collagen on cell proliferation and differentiation<sup>8</sup>.

The results of *in vitro* experiments enhance the development of *in vivo* models and explore the relationship between the properties of implant materials and their biological responses<sup>10</sup>.

Additional materials and forms of application has also been tested, and it was found that the use of HPMC gel does not generate disorders to the bone or to the transplanted cells since it is inert, as confirmed in the present study where 2% HPMC gel had no negative influence on tissue repair. Indeed, HPMC has convenient properties that make it suitable for pharmacology applications and food additive. However, its biodegradability varies from slow to very slow<sup>11</sup> (which explains the presence of inflammatory cells on bone repaired treated with HPMC even after 30 days.

In this study, we observed almost complete collagen reabsorption within 30 days and some remains of HPMC within repaired bone that did not appear to directly interfere with bone healing. However, the fact that only the control group had cortical bone outside the defect after 30 days, suggests that the body spend the time with the inflammatory process to reabsorb the biomaterial, instead to form and consolidate the bone. The use of biomaterials may also delay the process of bone repair, because the need to reabsorb the biomaterial, while it should be forming new bone.

---

---

The present study suggests that the use of bone marrow mononuclear cells does not contribute to accelerate the process of bone repair in non-critical defects.

## References

1. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 Apr;35(3):232-42.
  2. **Attawia M, Kadiyala S, Fitzgerald K, Kraus KH, Bruder SP. Cell-Based approaches for bone graft substitutes.** In Laurencin CT, (ed). **Bone Graft Substitutes.** ASTM International, West Conshohocken, PA. 2003. Pp. 126-141.
  3. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 2000 Jul;31(3):357-
  4. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.* 2009;51:25-41.
  5. Chan BP, Hui TY, Yeung CW, Li J, Mo I, Chan GC. Self-assembled collagen-human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. *Biomaterials.* 2007 Nov;28(31):4652-66
  6. Fritscher GG. Cultivo de células da medula óssea humana sobre membranas de colágeno bovino e arcabouços de ácido poliglicólico polilático (PLGA). Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 121p, Porto Alegre, 2007.
  7. Stafford GL. Are the outcomes of immediate and early single tooth implants comparable to conventionally placed implants? *Evid Based Dent.* 2009;10(3):77-8.
  8. Donzelli E, Salvade A, Mimo P, Vigano M, Morrone M, Papagna R, et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol.* 2007 Jan;52(1):64-73.
-

9. Caiazza S, Colangelo P, Bedini R, Formisano G, De Angelis G, Barrucci S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. *Implant Dent.* 2000;9(3):219-25.
  10. Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent.* 2003;12(2):175-81.
  11. Agis H, Beirer B, Watzek G, Gruber R. Effects of carboxy methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose on the differentiation and activity of osteoclasts and osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Nov;95(2):504-9.
-

**Figure 1. Photograph showing femur damages and experimental groups.** The bone damages were treated as follows: Group 1: BMMCs diluted with normal saline covered with collagen membrane; Group 2: BMMCs diluted with 2% of hydroxypropil methylcellulose (HPMC); Group 3: BMMCs diluted with 2% HPMC covered with a collagen membrane; and Group 4: control group, spontaneous repair.

**Figure 2. Cross-section of rat femurs 7 days after surgical procedure and treatment.** Each bone damage received the following treatments: (G1) BMMCs in DPBS and covered with collagen membrane, (G2) BMMCs in 2% HPMC; (G3) BMMCs in 2% HPMC, covered with collagen membrane; and (G4) control submitted to spontaneous repair. HE staining and 40 x magnification.

**Figure 3. Cross-section of rat femurs 18 days after surgical procedure and treatment.** Each bone damage received the following treatments: (a) BMMCs in DPBS and covered with collagen membrane, (b) BMMCs in 2% HPMC; (c) BMMCs in 2% HPMC, covered with collagen membrane; and (d) control submitted to spontaneous repair. HE staining and 40 x magnification.

**Figure 4. Cross-section of rat femurs 30 days after surgical procedure and treatment.** Each bone damage received the following treatments: (a) BMMCs in DPBS and covered with collagen membrane, (b) BMMCs in 2% HPMC; (c) BMMCs in 2% HPMC, covered with collagen membrane; and (d) control submitted to spontaneous repair. HE staining and 40 x magnification.

**Figure 5. Scanning electron microscopy of bone repair of femurs 7 days after surgical procedure and treatment.** Each bone damage received the following treatments: (a) BMMCs in DPBS and covered with collagen membrane, (b) BMMCs in 2% HPMC; (c) BMMCs in 2% HPMC, covered with collagen membrane; and (d) control submitted to spontaneous repair.

**Figure 6. Scanning electron microscopy of bone repair of femurs 30 days after surgical procedure and treatment.** Each bone damage received the following

---

treatments: (a) BMMCs in DPBS and covered with collagen membrane, (b) BMMCs in 2% HPMC; (c) BMMCs in 2% HPMC, covered with collagen membrane; and (d) control submitted to spontaneous repair.

---

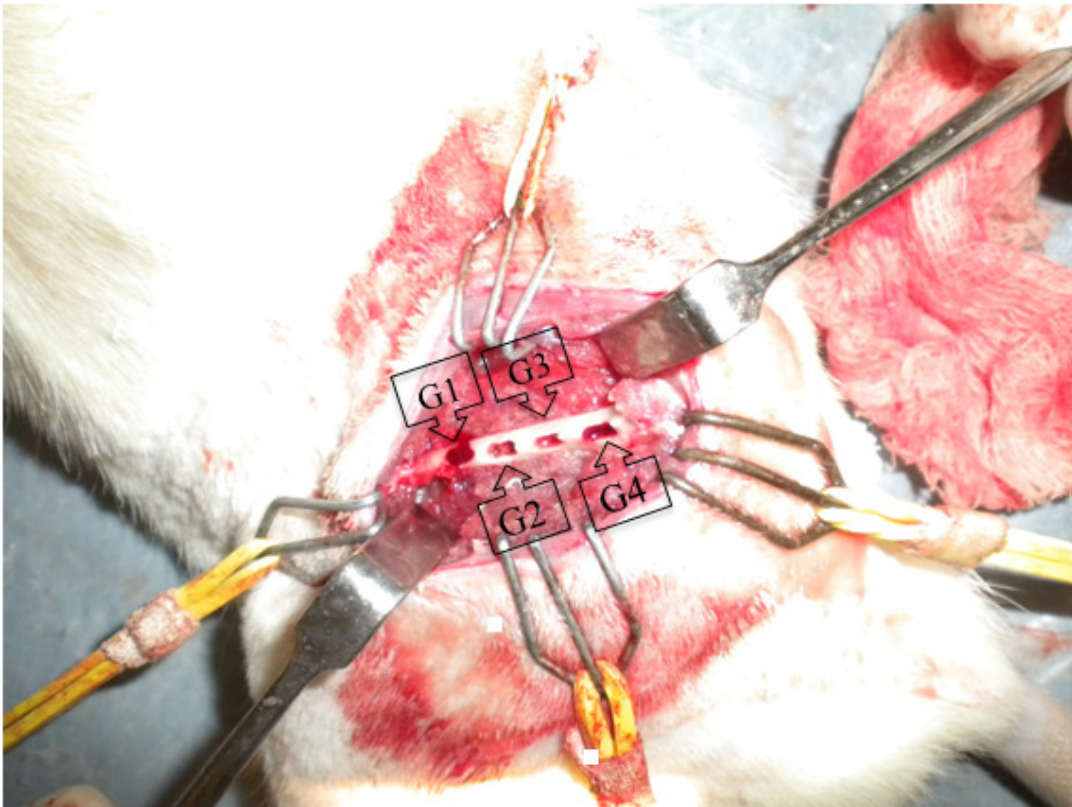


Figure 1



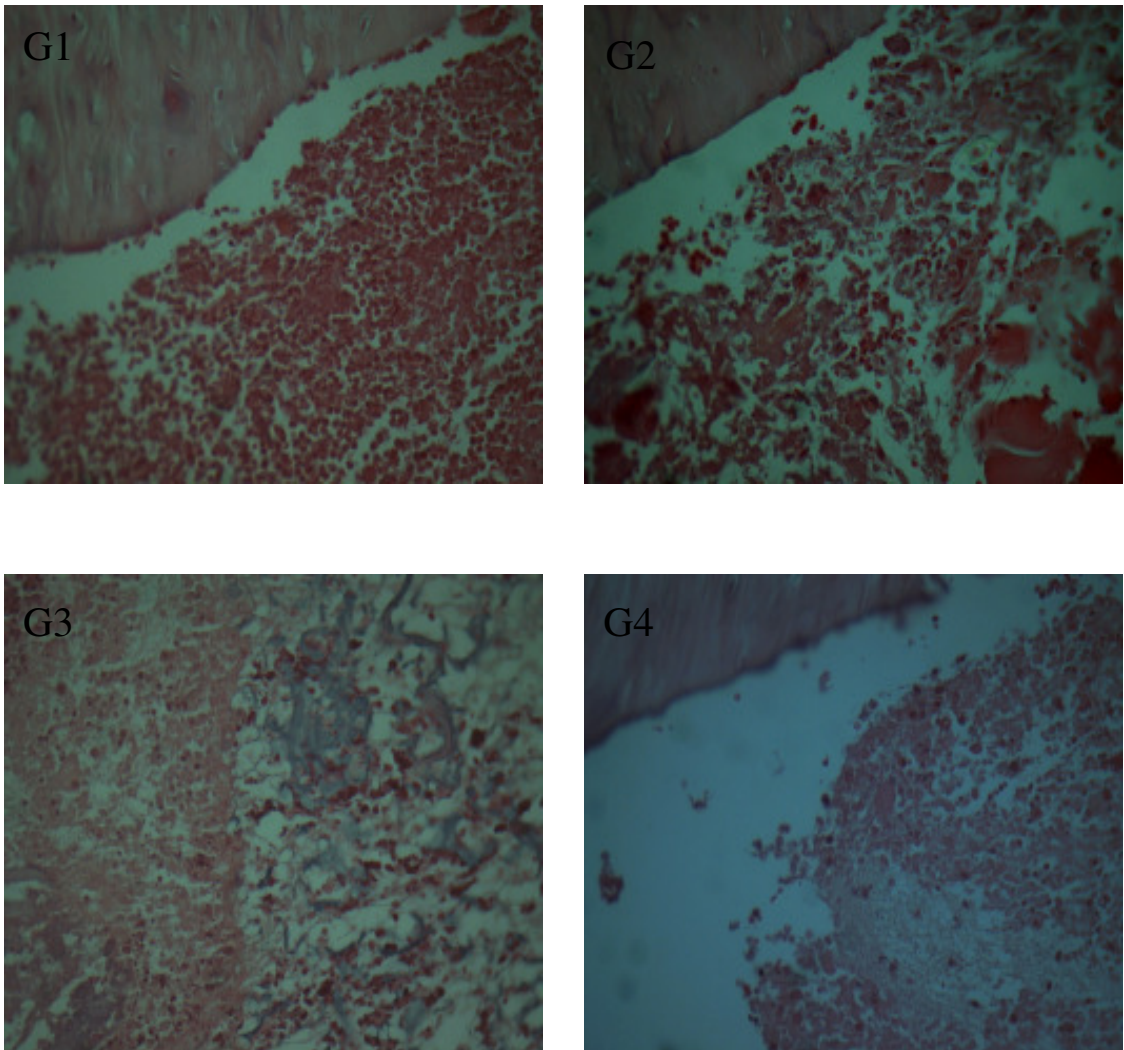


Figure 2.

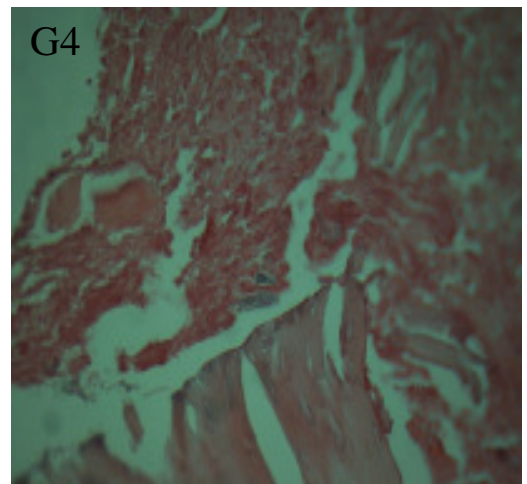
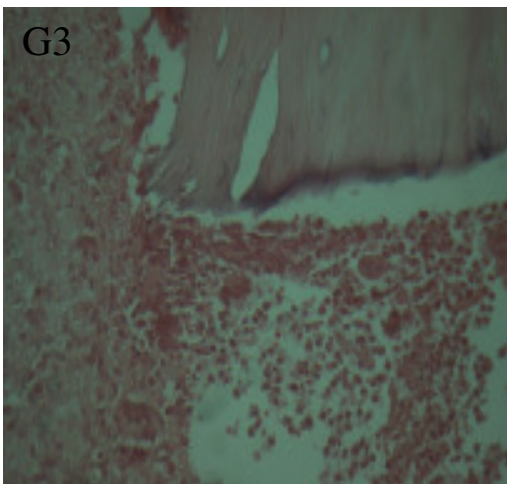
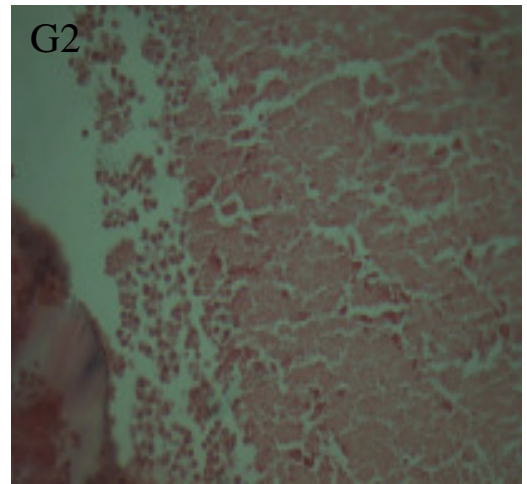
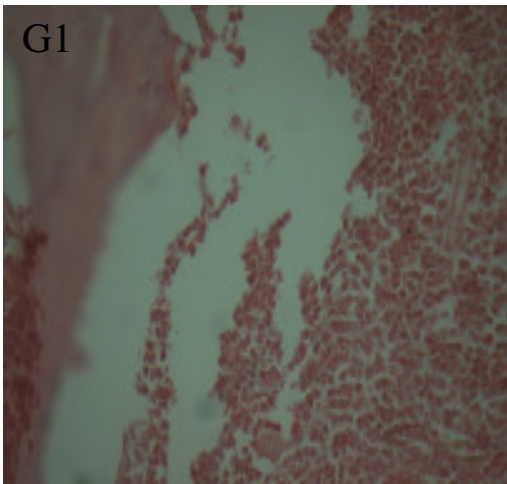


Figure 3.

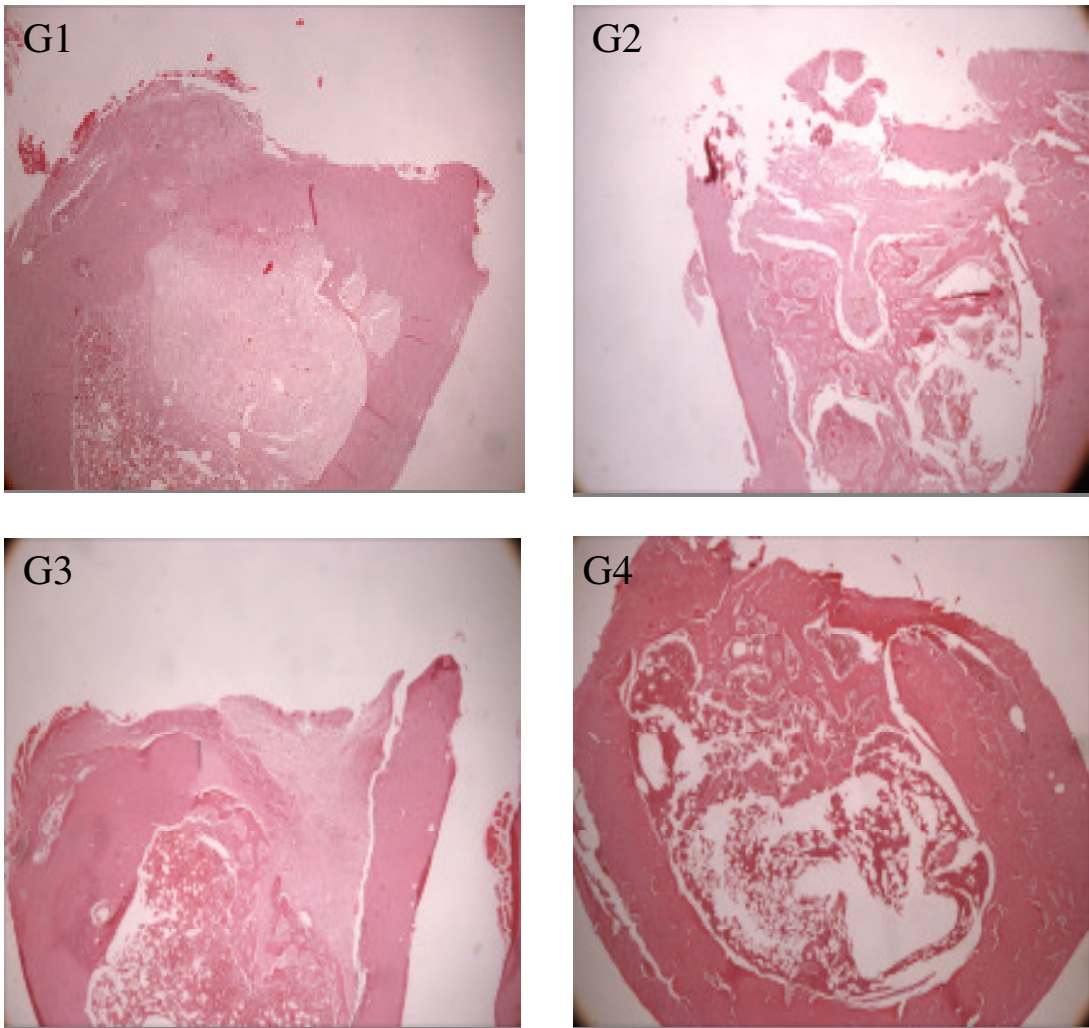


Figure 4.

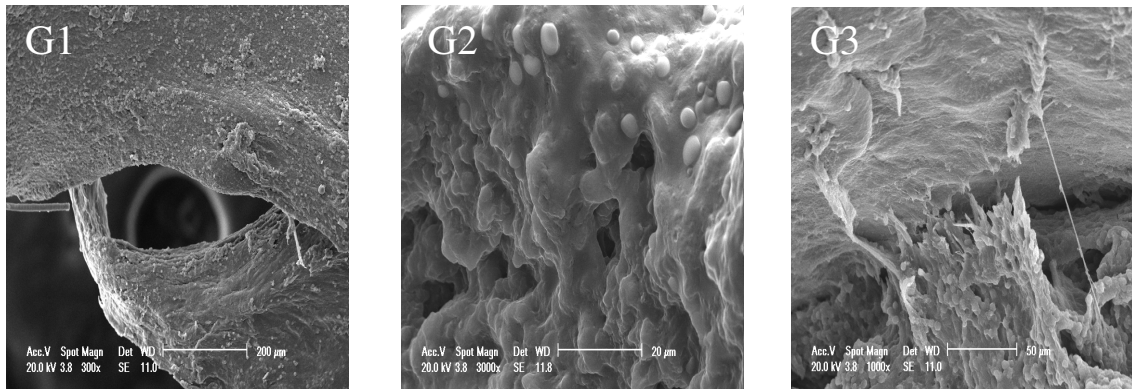


Figure 5.

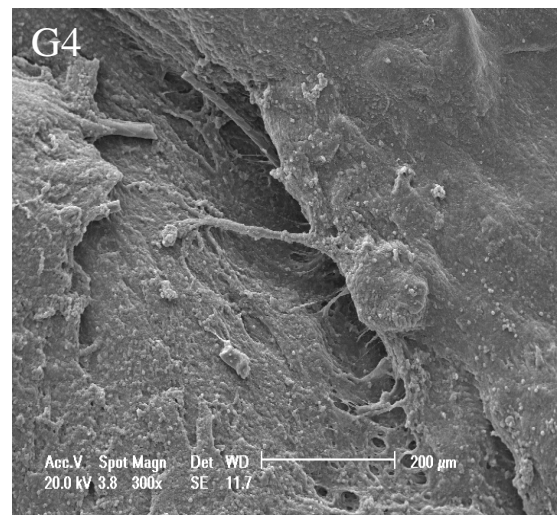
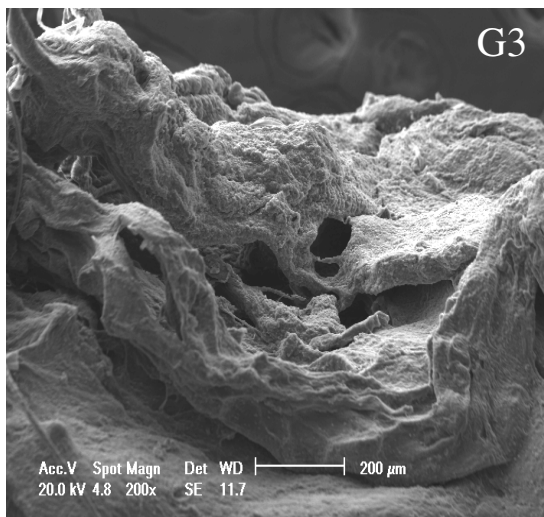
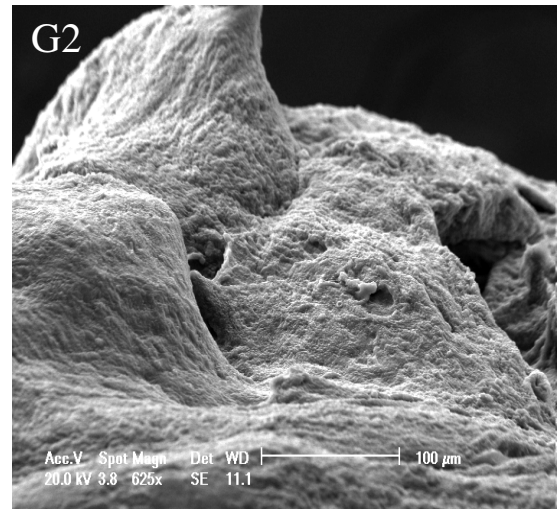
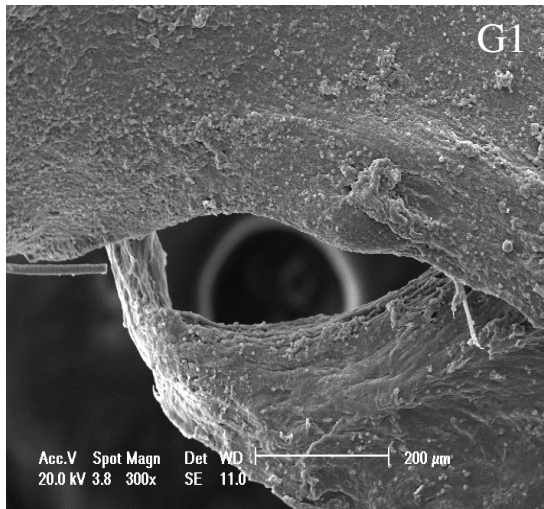


Figure 6.

**Table 1. Histological characteristics of bone repair determined by direct light microscope and HE staining seven days after surgery and treatment.**

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Bone defect Filled	x	x	v	x
Unfilled defect	v	v	x	v
External cortex repaired	x	x	x	x
Fibrous connective tissue	v	v	v	v
Hemorrhage	v	v	v	v
Acute inflammation	v	v	v	v
Chronic inflammatory process	x	x	x	x
New bone	x	x	x	x
Neovascularization	x	x	x	x
Exogenous material	x	v	v	x
Suppuration	x	x	v	x

(v) presence and (x) absence.

**Tabela 2. Histological characteristics of bone repair determined by direct light microscope and HE staining eighteen days after surgery and treatment.**

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Bone defect Filled	x	v	v	v
Unfilled defect	v	x	x	x
External cortex repaired	x	x	x	x
Fibrous connective tissue	v	x	v	v
Hemorrhage	v	x	v	x
Acute inflammation	x	x	x	x
Chronic inflammatory process	v	v	v	v
New bone	v	x	v	x
Neovascularization	x	x	x	x
Exogenous material	x	v	x	x
Suppuration	x	x	x	x

(v) presence and (x) absence.

**Table 3. Histological characteristics of bone repair determined by direct light microscope and HE staining thirty days after surgery and treatment.**

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Bone defect Filled	v	v	v	v
Unfilled defect	x	x	x	x
External cortex repaired	x	x	x	v
Fibrous connective tissue	v	v	v	v
Hemorrhage	v	v	x	x
Acute inflammation	x	x	x	x
Chronic inflammatory process	v	v	v	v
New bone	v	v	v	v
Neovascularization	v	x	v	x
Exogenous material	v	v	v	x
Suppuration	x	x	x	x

(v) presence and (x) absence.

**Tabela 4. Absolute frequency of histological characteristics of bone repair determined by direct light microscope and HE staining.**

	7 dias	18 dias	30 dias
Bone defect Filled	1	3	4
Unfilled defect	3	1	0
External cortex repaired	0	0	1
Fibrous connective tissue	4	3	4
Hemorrhage	4	2	2
Acute inflammation	4	0	0
Chronic inflammatory process	0	4	4
New bone	0	2	4
Neovascularization	0	0	2
Exogenous material	2	1	3
Suppuration	1	0	0