
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Cirúrgica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MODELO EXPERIMENTAL EM
RATOS NO REPARO ÓSSEO DO
FÊMUR UTILIZANDO CÉLULAS
MONONUCLEARES NO PLASMA
RICO EM PLAQUETAS**

MÁRCIA ILLANA KOPSCHINA

Porto Alegre
2010

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Cirúrgica

**MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS NO REPARO ÓSSEO DO FÊMUR
UTILIZANDO CÉLULAS MONONUCLEARES NO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS**

MÁRCIA ILLANA KOPSCHINA

Orientador: Jefferson Luis Braga da Silva

Co-orientadora: Gabriela Hoff

Dissertação apresentada à Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre em Medicina
e Ciências da Saúde
Área de concentração: Clínica Cirúrgica

PORTO ALEGRE
2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

K83m Kopschina, Márcia Ilana

Modelo experimental em ratos no reparo ósseo do fêmur utilizando células mononucleares no plasma rico em plaquetas / Márcia Ilana Kopschina. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

174 f.: il. graf. tab.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Gabriela Hoff.

Dissertação (Mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. ADESÃO CELULAR. 2. CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA. 3. PLASMA RICO EM PLAQUETAS. 4. REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA. 5. FÊMUR. 6. CAMUNDONGOS DE CEPAS ISOGÂMICAS. 7. RATOS ENDOGÂMICOS WKY. 8. FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA1. 9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 10. MODELOS ANIMAIS. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Hoff, Gabriela. III. Título.

C.D.D. 617.52

C.D.U. 616.718.4:611-018.4:599.323.4(043.3)

N.L.M.WE 200

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha filha Paula, que sempre esteve do meu lado, incondicionalmente.

Muito Obrigada!!!

"É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver"
(Gabriel Garcia Marquez)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Prof. Jefferson Luis Braga da Silva, meu orientador, pelos seus ensinamentos, pela contribuição inestimável para realização deste trabalho, pela objetividade, pelo exemplo profissional e por ter me acolhido como aluna no programa de pós-graduação desta instituição.

A Dra. Profa. Gabriela Hoff, minha co-orientadora, que através da sua experiência em Física Médica, profissionalismo, competência, foi essencial para realização desta dissertação.

A colega Cláudia Brambilla, pelo apoio tanto pessoal como profissional.

A colega Alessandra Deise Sebben, pela colaboração a este trabalho.

A Viviane Matzenbacher, Física, colaboradora do Grupo de Experimentação e Simulação Computacional em Física Médica da PUCRS.

A Dra. Profa. Denise Cantarelli Machado, do Instituto de Pesquisas Médicas (IPB) pela parceria para com este trabalho.

Ao Daniel Rodrigo Marinowic, por toda parte histológica e pela dedicação dada a este trabalho.

Ao Dr. Prof. Vinícius Duval, Thiago, pelo apoio e por ter disponibilizado as dependências do Laboratório de Patologia do HSL para a parte histológica.

Ao Técnico de radiologia Felipe Roxo, pela ajuda na descrição da técnica utilizada nas imagens dos animais.

Ao Dr. Prof. Mário Wagner, pela contribuição a este trabalho na parte da estatística.

Ao Dr. João Luis Dias de Oliveira, chefe do setor de Mamografia do Hospital São Lucas da PUC, por ter disponibilizado o serviço de Mamografia para a realização das imagens dos animais.

Ao bioterista, Gilmar Pontes Moreira, por sua incansável dedicação com os animais e para comigo.

Aos alunos da Graduação em Medicina, Camilla Araújo Assad, Tiago Alexi Freitas, Cristiano Ducan Aita, Leonardo Palma Kunh, pelo trabalho realizado nas microcirurgias.

A bolsista do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica Caroline Perez Klein pela dedicação imensa a este trabalho.

A Monica, Ester, Annerose, Cristiane, Samantha, Rosecler, por terem compartilhados momentos de tristeza, de angústia e de felicidade, enfim pelo companheirismo durante todo esse tempo de convivência.

A minha amiga Rosane Fehse pelo apoio pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Vanessa e Ernesto pelo auxílio.

Muito Obrigado a todos!!!!!!

RESUMO

MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS NO REPARO ÓSSEO DO FÊMUR UTILIZANDO CÉLULAS MONONUCLEARES NO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

INTRODUÇÃO: As células mononucleares (CMs) da medula óssea têm sido utilizadas em diversas patologias na tentativa de regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar a adesão de células mononucleares sobre um defeito crítico, com a adição do plasma rico em plaquetas (PRP) e/ou TGF- β 1 (Fator de crescimento transformador Beta 1) e, por fim, verificar o reparo ósseo dos sítios defeituosos dos fêmures dos ratos.

MÉTODOS: Foi criado um defeito crítico bilateral nos fêmures de 33 ratos Wistar-Kyoto. Células mononucleares da medula óssea, TGF- β e PRP foram adicionadas no lado tratado da lesão e soro fisiológico no lado contralateral. Avaliou-se a adesão de células mononucleares sobre o defeito crítico e o reparo ósseo.

RESULTADOS: A presença e conseqüente adesão das células mononucleares administradas nos animais tratados não foram evidenciadas através de técnica de PCR. As análises radiográficas evidenciam fechamento da lesão nos grupos CMs +TGF- β e CMs + PRP, porém, não podemos afirmar se foi pelos tratamentos administrados ou pela própria regeneração óssea, quando analisadas em 6 e 10 semanas, haja visto não apresentarem diferenças significativas entre os grupos.

CONCLUSÕES:

- a) as células mononucleares da medula óssea não aderiram ao defeito crítico criado no fêmur do rato;
- b) Não foi possível avaliar a eficiência relativa dos tratamentos propostos no reparo ósseo, uma vez que não houve diferenças significativas na avaliação dos grupos.

Palavras-chaves: defeito crítico, fêmur, PRP, TGF- β 1, CMs

ABSTRACT

EXPERIMENTAL MODEL IN RATS IN THE FEMORAL BONE REPAIR IN MONONUCLEAR CELLS USING PLATELET-RICH PLASMA

BACKGROUND: Mononuclear cells (MCs) from bone marrow have been used in various treatments of diseases in an attempt to regenerate tissues. The objective of this study was to evaluate the access and proliferation of mononuclear cells in a critical defect, with the addition of platelet-rich plasma (PRP) and / or TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), and then to evaluate bone repair at defective sites on the femurs of rats.

METHODS: We created a critical defect on the bilateral femurs of 33 Wistar-Kyoto rats. Mononuclear bone marrow cells, TGF- β and PRP were added to the lesion on the treated side and saline on the contralateral side. We determined the adhesion of mononuclear cells at the critical defect and bone repair.

RESULTS: The presence and consequent access of mononuclear cells administered in the treated animals were shown by the PCR technique. Radiographic analysis showed closure of the lesion groups in MCs + TGF- β and MCs + PRP, however, we can not say whether the treatment was administered or by the bone regeneration, when analyzed at 6 and 10 weeks, there is seen not differ substantially between groups.

CONCLUSIONS:

- a) Bone marrow mononuclear cells did not adhere at the critical defect created in the rat femur;
- b) It was not possible to assess the relative efficiency of the proposed treatments on bone healing, since no significant differences in the evaluation of groups.

KEYWORDS: femur, PRP, TGF- β 1, MCs, rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contador de células automatizado Coulter – HSL/PUCRS.....	40
Figura 2. Fêmures e tíbias utilizados para a coleta da Medula óssea.....	41
Figura 3. Separação da fração mononuclear do sangue da medula óssea por gradiente de densidade sobre Histopaque®.....	42
Figura 4. Fração mononuclear (anel que está sob a fração mais clara) situada sobre Histopaque® após centrifugação.....	42
Figura 5. Exposição do fêmur para execução da lesão	44
Figura 6. Defeito crítico de 5mm de largura por 2,5mm de largura, usando broca Carbide haste longa n° 8.....	45
Figura 7. Aparelho Mamografia Mammomat 3000/HSL.....	47
Figura 8. Posição rato decúbito ventral aparelho Mammomat 3000	48
Figura 9. Imagem do animal em decúbito ventral indicando a área do defeito crítico criado (POP).....	48
Figura 10. Fotografia lâmina osso normal adjacente ao tratamento com coloração picosirius	53
Figura 11. Fotografia lâmina polarizada osso com lesão	53
Figura 12. Gráficos da evolução do fechamento da área da lesão para 6 e 10 semanas dos grupos controle e tratado e seus respectivos valores médios e desvios padrões para (a) grupo CMs + TGF- β , (b) grupo CMs + PRP e (c) grupo CMs + PRP + TGF- β	57
Figura 13. Gráficos da evolução do comprimento da lesão para 6 e 10 semanas dos grupos controle e tratado e seus respectivos valores médios e desvios padrões para (a) grupo CMs +TGF- β , (b) CMs+PRP e (c) CMs + PRP + TGF- β	58

Figura 14. Gráficos da taxa de redução da área na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF- β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF- β	60
Figura 15. Gráficos da taxa de redução de comprimento na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF- β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF- β	61
Figura 16(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X	64
Figura 16(b). Fotografia de lâmina histológica polarizada com picrossirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão . Aumento 50X	64
Figura 17(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + TGF- β . Aumento 50X.....	65
Figura 17(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + TGF- β . Aumento 50X	65
Figura 18(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + TGF- β . Aumento 50X	66
Figura 18(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + TGF- β . Aumento 50X	66
Figura 19(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X	67
Figura 19(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius polarizada, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão. Aumento 50X	67
Figura 20(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrossirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP. Aumento 50X	68

Figura 20(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP . Aumento 50X.....	68
Figura 21(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP. Aumento 50X	69
Figura 21(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP . Aumento 50X.....	69
Figura 22(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X.....	70
Figura 22(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão. Aumento 50X	70
Figura 23(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X	71
Figura 23(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X.....	71
Figura 24(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X	72
Figura 24(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X	72
Figura 25. Gráficos de avaliação neoformação óssea com técnica picosirius	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* utilizados, reagentes e condições de amplificação.....50

Tabela 2. Distribuição de animais por grupo, perdas e áreas de tratamento analisadas. Análise 10 semanas pós-operatório para todos os grupos63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aFGF	Fator de crescimento de fibroblasto ácido
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
β	Beta
BMPs	Proteína Morfogenética óssea
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-F	<i>colony forming units – fibroblastic</i> Células formadoras de colônias fibroblásticas
CMs	Células Mononucleares
cm	Centímetro
CTs	Células Tronco
CTM	Células tronco Mesenquimais
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
FAMED	Faculdade de Medicina
FGF	Fator de crescimento dos fibroblastos
g	Gramas
G	Força gravitacional

g/L	Gramas por litro
H₂O	Água
HE	Hematoxilina-Eosina
HSL	Hospital São Lucas
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à Insulina-I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à Insulina-II
IP	Placas de Imagem (Image Plate)
kDa	Quilo-dalton (unidade de massa atômica)
kVp	Quilovoltagem
kg	Kilograma
mAs	Miliamperes
mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama por mililitro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
Mo-Mo	Molibdênio
N	Número
Pb	Pares de base
PBS	Salina Tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de Plaquetas
POP	Programa Operacional Padrão
PRP	Plasma Rico em Plaquetas

PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Rh	Recombinante humana
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-Beta
TGF-β2	Fator de crescimento transformador-Beta-2
U	Unidade
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Microgramas
μg/mL	Microgramas/mL
μm	Micrômetro
USA	Estados Unidos da América do Norte
V	Voltz
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
®	Marca registrada
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3 REFERENCIALTEÓRICO	22
3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	22
3.2 CÉLULAS TRONCO	25
3.3 CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA	27
3.4 CÉLULAS TRONCO NA REGENERAÇÃO TECIDO ÓSSEO	30
3.5 FATORES DE CRESCIMENTO	31
3.5.1 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β).....	31
3.5.2 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 DELINEAMENTO	36
4.1.2 Amostra	36
4.2 MÉTODOS.....	36
4.2.1 Preparação.....	36
4.2.2 A seleção dos animais para a realização deste protocolo.....	37
4.2.3 A manutenção dos animais para a realização deste protocolo	38
4.2.4 Descrição dos fatores de crescimento utilizados neste protocolo e seus processos de extração	38
4.2.5 Protocolo de criação do defeito crítico.....	43
4.2.6 Exames Radiográficos para acompanhamento das lesões.....	46

4.2.7 Eutanásia	49
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO DNA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	49
4.3.1 Extração de DNA.....	49
4.3.2 Análise Molecular – PCR.....	49
4.4 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA POR TÉCNICA DE PICROSIRIUS	51
4.4.1 Coloração Picrosirius.....	51
4.4.2 Técnica de coloração	51
4.4.3 Análise de imagens – Histomorfometria	52
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	54
5 RESULTADOS	55
5.1 REPARO POR IMAGENS	55
5.2 AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA.....	55
5.3 ADESÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	62
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA PELA TÉCNICA DE PICROSIRIUS	62
6 DISCUSSÃO.....	75
6.1 LIMITAÇÕES DO MODELO EXPERIMENTAL SUGERIDO.....	79
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	
Anexo A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	93
Anexo B. Carta de Alteração e aprovação do Comitê de Ética para uso de Animais	94
Anexo C. Artigo dissertação em Português.....	95
Anexo D. Aceite da Revista Bone	127

Anexo E. Artigo dissertação de Mestrado e versão para publicação à Revista Bone.....	128
Anexo F. Procedimento Operacional Padrão (POP)	160

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo passa constantemente por um processo morfológico dinâmico, seguindo sua formação original. Desta forma, o metabolismo ósseo é mantido por um constante processo de reabsorção e de neoformação em resposta às mudanças físicas e biomecânicas. Este evento é controlado por dois mecanismos: a regulação sistêmica e a local, que através de hormônios controlam os níveis de cálcio e de fosfato. Junto a isso ainda existem os fatores de crescimento que atuam sobre todas as células da estrutura óssea auxiliando no processo de reparo tecidual^{1, 2,3}.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autógeno e sua estratégia terapêutica baseia-se na aceleração da cicatrização, por meio da concentração dos fatores de crescimento presentes no citoplasma plaquetário, que são os indicadores universais de quase todos os eventos cicatriciais⁴.

Sendo o PRP fruto de uma preparação autógena realizada momentos antes do procedimento cirúrgico, o mesmo reduz o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas por ser um produto isento de características tóxicas ou imunorreativas³.

Outra nova área da medicina que vem sendo desenvolvida e abrange perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas sendo chamada medicina regenerativa. Essa consiste na utilização de células tronco, fatores de proliferação, de diferenciação das células e de biomateriais, os quais têm sido uma esperança para os pesquisadores que vislumbram tratar de doenças incuráveis ou daquelas

com tratamento insatisfatório⁵. As freqüentes doenças ósseas, como fraturas, doenças ósseas generalizadas como osteoporose, podem causar perdas tissulares consideráveis, sobrepondo à capacidade de reparo normal do tecido ósseo⁶. Há relatos de que os tecidos adultos possuem células tronco próprias residentes e que ocorre migração de células tronco do sangue periférico para outros órgãos, como o coração. Igualmente, células já diferenciadas podem proliferar em resposta à agressões teciduais, indicando que o processo de regeneração ocorre nestes tecidos, embora possa não ser eficiente o suficiente para levar à cura, dependendo do grau de dano tecidual que tenha ocorrido^{6,7}.

Estudos descritos na literatura têm mostrado que entre as células da camada mononuclear obtida de medula óssea, de cordão umbilical e em outros tecidos, existem tanto células tronco hematopoiéticas quanto células tronco mesenquimais^{8,9}. As células tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células do tecido sanguíneo, e possuem como proteína de membrana característica o CD34. As células tronco mesenquimais dão origem às células que irão formar os outros tecidos do organismo, e expressam em suas membranas os marcadores CD105 (endoglina) e CD117 (c-kit)^{10,11,12}. Assim, é possível selecionar as populações celulares específicas mais adequadas para a regeneração do tecido de interesse.

Portanto, esta pesquisa tem como objetivos avaliar a adesão de células mononucleares sobre o defeito crítico, com a adição do gel plasma rico em plaquetas e/ou fator de crescimento transformador Beta 1 e verificar o reparo ósseo nas lesões, bem como comparar quantitativamente a eficiência de reparo ósseo entre três diferentes propostas de tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adesão de células mononucleares cultivadas sobre o defeito crítico, com adição do gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e/ou TGF- β 1 (fator de crescimento transformador Beta 1) e, por fim, verificar o reparo ósseo dos sítios defeituosos dos fêmures dos ratos Kyoto.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar quantitativamente a eficiência de reparo ósseo entre três diferentes propostas de tratamento.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto serve de suporte para as partes moles e proteção de órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada¹³.

Para o mesmo autor, o osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado, a matriz óssea. As células são: os osteócitos, que se situam em lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo. Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, respectivamente¹³.

O metabolismo ósseo é mantido por um contínuo processo de reabsorção e de neoformação. Dois mecanismos têm sido postulados para o controle desse processo: a regulação sistêmica, por meio de hormônios reguladores da taxa de cálcio e fosfato e a regulação local, na qual ocorre a

participação de fatores de crescimento que atuam sobre todas as células de estrutura óssea, auxiliando no reparo ósseo¹.

Burkitt *et al.*¹⁴, propuseram o reparo da fratura como modelo de reparo ósseo. Neste modelo, a neoformação óssea é tanto intramembranosa como endocondral. Segundo os autores, no local da fratura forma-se um coágulo sangüíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno altamente vascular (tecido de granulação). Este tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Células diferenciadas em condroblastos substituem o tecido granuloso fibroso com cartilagem hialina, formando um calo provisório que é flexível. Este calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa.

Raisz, 1999¹⁵ salienta que o osso é um tecido metabolicamente ativo que está em constante renovação. Isso mantém sua integridade estrutural e a homeostasia mineral, ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólicos (aposição) e catabólicos (reabsorção)¹⁶.

O tecido ósseo é um tecido multifuncional constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. O primeiro tipo celular deriva-se das células tronco mesenquimais da medula óssea e se localiza na superfície das trabéculas, no canal de Havers do tecido ósseo osteônico e no perióstio, e tem a função principal de sintetizar matriz óssea não mineralizada (osteóide) constituída por colágeno tipo I, por proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fibronectina e tenascina)¹⁷.

Hollinger *et al.*¹⁸ relatam o reparo de fratura óssea como modelo de estudo na regeneração óssea. Salientaram a importância dos fatores de crescimento tais como TGF- β 1 (Fator de Crescimento Transformador Beta 1), FGF (Fator de crescimento dos fibroblastos), VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial) e BMPs (Proteína Morfogênica Óssea) nos processos de reparo ósseo.

A formação de tecido ósseo é influenciada por muitos fatores, sendo o principal o suprimento sangüíneo. O mesmo proporciona a oxigenação tecidual e, conseqüentemente, a formação colágena, a proliferação de

fibroblastos e capilares, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, além da formação e da mineralização no calo ósseo¹⁹.

Anselme²⁰ refere que a matriz celular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteoclastina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas essas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos.

Conforme Ramoshebi *et al.*²¹ o osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de grande capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma integração biológica de processos bioquímicos, celulares e hormonais, continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação óssea. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual óssea que vão determinar a capacidade de osteoindução: presença de sinais osteoindutores solúveis, a viabilidade das células tronco indiferenciadas em responder e ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, além de uma adequada matriz extracelular.

Os pré-osteoblastos representam um estágio de transição entre uma alta proliferação de células osteoprogenitoras e osteoblastos maduros, apresentando baixos níveis de proteínas ósseas, como a fosfatase alcalina, a osteonectina e a osteopontina, entre outras. Essas células fornecem importantes informações sobre resposta de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização^{22, 23}.

Os osteoblastos se diferenciam em osteócitos quando são aprisionados na matriz mineralizada que produzem, tornando-se incapazes de se dividir; e os osteoclastos, outro tipo celular que não tem origem nas células osteoprogenitoras, são derivados dos precursores da linhagem hematopoiética e responsáveis pela reabsorção óssea²⁴.

3.2 CÉLULAS TRONCO

As células tronco são células indiferenciadas que podem ser obtidas do embrião, do feto ou de indivíduos adultos²⁵. Elas são capazes de se dividir por longos períodos e se diferenciar em tipos celulares especializados²⁶.

A utilização das células tronco embrionárias pode trazer alguns riscos, tais como a proliferação descontrolada, resultando na formação de teratomas e de outros tumores²⁷. O uso de células embrionárias envolve ainda questões éticas e religiosas, o que não acontece com o uso de células tronco adultas²⁶.

Wagers e Weisman²⁸, afirmam que as células tronco são classificadas em: totipoentes ou embrionárias capazes de se diferenciar em todas as células do indivíduo completamente formado; pluripotentes, capazes de se diferenciar em quase todos os tecidos, com exceção da placenta e dos anexos embrionários; multipotentes, que originam menor número de linhagens celulares e unipotentes, que se diferenciam em um único tecido.

Zago *et al.*²⁹ afirmaram que as células tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas; c) são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular.

A medicina regenerativa ou terapia celular procura empregar células tronco embrionárias ou células tronco adultas, dirigindo sua diferenciação no sentido de um tecido específico para repor ou reparar tecidos lesados ou destruídos²⁹.

Existem atualmente duas modalidades mais utilizadas em terapia celular com CTs: as CTs embrionárias, derivadas de blastocistos e CTs somáticas adultas³⁰.

As CTs embrionárias são uma classe especial de CTs derivadas de embriões mamíferos no estágio de blastocisto. Neste estágio, células da

massa celular interna, que vão dar origem a todos os tecidos do indivíduo adulto, ainda não se diferenciaram e podem ser colocadas em cultura de forma a estabelecer uma linhagem celular pluripotente. As primeiras linhagens de CTs embrionárias humanas foram descritas em 1998 por Thompson e cols. e desde então aumentam progressivamente pesquisas nesta área, envolvendo melhorias de cultura, indução e diferenciação em diversos tecidos³¹.

As CTs adultas, denominadas CTs somáticas, têm uma capacidade limitada de diferenciação, em geral restrita ao tecido de onde derivam. Como em geral podem dar origem a um único ou alguns poucos tipos de células diferenciadas, são classificadas de CTs multipotentes^{32,33}. No entanto, uma das principais vantagens do uso de células tronco adultas é que estas são embriologicamente mais evoluídas e, por isso, percorrem um caminho menor até a diferenciação, diminuindo o risco de desvios ontogênicos e de outros efeitos indesejados³⁴.

Existem vários tecidos que são fontes de células tronco mesenquimais (CTM), em maior ou menor número. Dentre eles temos: intestino, tecido adiposo, membrana sinovial, pulmão³⁵, fígado, intestino e sangue periférico³⁶, sistema nervoso central³⁷, miocárdio³⁸, sangue do cordão umbilical, placenta³⁹, medula óssea⁴⁰ e vasos sangüíneos, córnea e retina⁴¹. As CTM são mais estudadas em comparação às de outros sítios do organismo pelo fato de serem facilmente isoladas e possuírem grande capacidade de expansão e diferenciação *in vitro*⁴². Em humanos apresentam melhor diferenciação osteogênica e condrogênica, comparadas às células tronco do tecido adiposo³⁵. Estas células também podem se diferenciar em tenócitos, adipócitos, miócitos⁴³ e em células não mesenquimais representadas pelas células neurais e epiteliais³⁵.

3.3 CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Para Junqueira e Carneiro⁴⁴, as células pluripotentes são caracterizadas por serem células indiferenciadas que se dividem continuamente durante a vida de um animal, produzindo células que evoluem e gerando células irreversivelmente diferenciadas. O conceito de células pluripotentes é importante nas ciências da saúde para compreender a hemocitopoese e a diferenciação que ocorre em vários tecidos e suas aplicações práticas.

Segundo Krebsbach *et al.*⁴⁵, o estroma da medula óssea consiste de uma população heterogênia de células que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Portanto, esse estroma contém células com características de células tronco, as quais se diferenciam em osso, cartilagem, adipócitos, além de constituírem um suporte hematopoiético para os tecidos.

A cultura de células do estroma da medula óssea permite analisar a expressão de proteínas ósseas, tanto em nível populacional quanto em nível celular individual. A composição celular complexa dessas culturas permite avaliar a distribuição, especificidade e expressão temporal de fenótipos e genótipos de marcadores osteoblastos como a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. O envolvimento dessas proteínas na formação óssea, assim como a regulação de sua produção e ação, pode metizar as interações celulares que ocorrem *in vivo* durante a osteogênese⁴⁶⁻⁴⁷.

As células da medula óssea constituem-se em uma população heterogênia, contendo populações celulares osteogênicas, fibroblásticas e adipocíticas. As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos, os quais produzem uma matriz celular que irá posteriormente se mineralizar⁴⁸. Segundo Petite *et al.*⁶, as células do estroma da medula óssea são comprometidas com a regeneração, recriando um meio embrionário em tecidos adultos lesados. Além disso, os autores salientam que tais células têm propensão de se aderirem em cultura, permitindo-se isolarem de outras

células medulares, sendo possível verificar a sua proliferação e a diferenciação em osteoclastos.

A medula óssea contém células indiferenciadas com um grande potencial osteogênico, como as células precursoras osteogênicas⁴⁹.

Alberts *et al.*⁵⁰ afirmam que célula tronco hematopoiética (ou formadoras de sangue) é dessa forma, pluripotente, dando origem a todos os tipos de células sangüíneas terminalmente diferenciadas, bem como outros tipos de células, tais como osteoblastos de osso.

A partir da diferenciação das células tronco, são produzidos os diversos tipos de células sangüíneas, vermelhas e brancas. Dentre as células brancas, pode-se citar os granulócitos, que se subdividem em três classes: neutrófilos (fagocitam e destroem microorganismos; controlam as infecções); basófilos (secretam histamina auxiliando na reação inflamatória) e eosinófilos (possuem função de controlar a infecção e auxiliam nos processos inflamatórios). Outra célula proveniente de células brancas são os monócitos que dão origem aos macrófagos que fazem o reconhecimento e a remoção de células senescentes ou mortas no tecido, são os únicos a englobar microorganismos grandes; e originam também as células dentríticas que são apresentadoras de antígenos estranhos aos linfócitos desencadeando resposta imune. Os linfócitos, também são produzidos a partir das células brancas, estão diretamente envolvidos com a resposta imune, e se subdividem em duas classes: células B que produzem anticorpos e células T que matam células infectadas por vírus e controlam a atividade de outras células brancas⁵⁰.

Katagiri e Takahashi²² afirmaram que os osteoblastos são células especializadas que atuam diretamente sobre a formação óssea nos vertebrados. O tecido ósseo consiste, principalmente, de cristais de hidroxiapatita e vários tipos de proteínas na matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e proteoglicanos. Esses cristais de hidroxiapatita quanto às proteínas são regulados pelos osteoblastos e, além disso, a alta atividade enzimática da

fosfatase alcalina e a resposta a hormônios e a citocinas são características importantes dos osteoblastos.

Em um estudo realizado por Guarita - Souza *et al.*⁹, comparando o uso de células mesenquimais ou mononucleares de medula óssea no infarto agudo do miocárdio, concluiu que ambos os tipos celulares mostraram regeneração vascular e estabilização da fração de ejeção.

Existem muitas dúvidas acerca de qual fração celular apresenta maior plasticidade, implicando em melhores resultados na regeneração tecidual. Segundo Gowdak *et al.*⁵¹, a utilização de um conjunto de células, como as CMs, seria melhor que um único tipo celular, acreditando que estas células dariam o primeiro suporte à proliferação e à manutenção das CTs.

Loodish H. *et al.*⁵² relatam que as células hematopoiéticas são derivadas de células tronco pluripotentes e que têm a capacidade de gerar certo número de tipos celulares diferentes, mas não todos. Células tronco são células com alto poder de auto-renovação, ou seja, são capazes de se dividir assimetricamente para formar uma célula tronco filha idêntica a ela própria e outra célula filha, que é diferenciada e com potencial restrito. Esta última, por sua vez, inicia uma via para a produção de células mais diferenciadas e, quando se divide, uma de suas filhas será do mesmo tipo que a célula tronco com potencial restrito que aquela que lhe deu origem, e a outra será uma célula progenitora de um tipo de célula diferenciada. As células progenitoras podem então se dividir para dar origem a novas células progenitoras, e quando recebem um sinal apropriado, podem se diferenciar em células definitivamente diferenciadas que não se dividem mais.

As CMs podem ser utilizadas cerca de uma a duas horas após a coleta da medula óssea, tornando factível seu uso em patologias agudas como perfurações traumáticas, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico e também durante o período transoperatório⁹.

Alguns estudos em regeneração tecidual e cicatrização utilizam células mesenquimais, outros, hematopoiéticas, e outros ainda, a porção mais primária, as CMs. Existem métodos e custos distintos de isolamento

destas frações celulares da medula óssea. A fonte mais acessível para terapia com CTs são as CMs⁵³.

3.4 CÉLULAS TRONCO NA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

A medula óssea contém, além das células tronco hematopoiéticas e das células tronco endoteliais, uma população rara de células tronco multipotenciais, capaz de suportar a hematopoese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares como os condrócitos, os osteócitos e os adipócitos⁵⁴.

Estas células foram originalmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e cols., em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas - *CFU-F= colony forming units – fibroblastic* (Friedenstein, *et al.*, 1966)⁵⁵. Mais recentemente, estas células têm sido denominadas células tronco mesenquimais – CTM⁵⁶. A terapia com células tronco mesenquimais é um procedimento promissor para o tratamento de vários tipos de doenças degenerativas. A principal razão, em suporte a esta afirmação, decorre do fato de que as CTM possuem relevante capacidade plástica, sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*. Neste contexto, As CTM estão sendo testadas para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas, lesões ósseas, condrais, pulmonares, em doenças genéticas como osteogênese imperfeita e a síndrome de Hurler, entre outras⁵⁷.

3.5 FATORES DE CRESCIMENTO

3.5.1 Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)

O Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) pertence à classe de fatores de crescimento multifuncionais que demonstra ser um dos mediadores da fisiologia celular normal e da embriogênese tecidual, no qual participa de uma série de respostas associadas à inflamação e ao reparo tecidual⁵⁸.

Conforme Wozney *et al.*⁵⁹ com o avanço nas investigações foi possível promover a purificação da atividade osteoindutora, além do seqüenciamento e da clonagem de cada BMP. Um ano depois, o autor mostrou, em outro trabalho, o isolamento do clone de cDNA e a expressão de três proteínas recombinantes humanas, as quais chamaram de BMP-1, BMP-2 e BMP-3 sendo os dois últimos membros da superfamília do TGF- β , enquanto a primeira (BMP-1) aparece como uma nova molécula reguladora. Em 1990, Wozney *et al.*⁶⁰ concluíram que, após análise da seqüência de aminoácidos da BMP humana, é possível afirmar que elas são muito semelhantes umas às outras e que formam um subgrupo da superfamília do TGF- β .

Wosney *et al.*⁶⁰ salientaram que o crescimento e a manutenção do tecido ósseo constituem um processo complexo influenciado por hormônios sistêmicos, que localmente produzem fatores de crescimento. Além do hormônio da paratireóide, da calcitonina e da vitamina D, que são conhecidos efetores da remodelação óssea, os fatores de crescimento e transformação- β 1 (TGF- β 1), de crescimento e transformação- β 2 (TGF- β 2), de crescimento de fibroblasto básico (BFGF), de crescimento de fibroblasto ácido (AFGF) e de crescimento semelhante à insulina I e de insulina II (IGF-I e IGF-II) estão presentes em grande quantidade na matriz óssea. Além disso, tem sido demonstrado que essas substâncias possuem diversos efeitos no crescimento e na função das células ósseas *in vitro*.

Muitos hormônios e fatores locais influenciam na diferenciação de osteoblastos. No entanto, as TGF- β guardam um interesse particular porque são produzidas por osteoblastos, além de possuírem a habilidade sobre certas circunstâncias, de induzir a formação óssea *in vivo* por uma cascata de eventos que inicia com a proliferação das células tronco e finalizam com a formação de osso⁶¹.

O TGF- β é um termo aplicado para uma “super” família de fatores de crescimento e de diferenciação celular⁶². As proteínas TGF- β 1 e TGF- β 2 são os fatores de crescimento mais protéicos e genéricos envolvidos com a reparação do tecido conjuntivo em geral e regeneração óssea, tendo como função mais importante do TGF- β 1 e do TGF- β 2 a quimiotaxia e a mitogênese dos precursores de osteoblastos e a sua habilidade para estimular sua deposição da matriz do colágeno na reparação da ferida e do osso.²

Segundo Honda *et al.*⁶³, o TGF- β e as BMPs podem atuar organizando o início da diferenciação osteogênica, além de ser possível que sua ação local sofra influência de moduladores locais sistêmicos. Para os autores, cada subgrupo da família de BMPs teria condições de desempenhar um papel específico no início da migração de células tronco, assim como na proliferação e na diferenciação de atividades envolvendo morfogênese óssea. Além disso, sugeriram haver condições de que a ação da BMPs sobre os osteoblastos pode envolver uma complexa regulação da expressão dos gênicos, incluindo aumento e diminuição da expressão do mRNA para as proteínas da família das BMPs.

Os fatores de crescimentos são polipeptídios, em geral sintetizados por um tecido específico, no qual em baixas concentrações, atuam como reguladores locais na função celular. Tais fatores de crescimento promovem por sua ativação por se ligarem a grandes receptores específicos transmembrana, na célula-alvo, a partir de uma cascata de atividades estabelecidas pela proteína quinase. Via de regra, o número de receptores ativos em uma célula diminui quando os fatores de crescimento estão presentes em excesso e aumentam quando há uma deficiência de tais

substâncias. O tecido ósseo contém vários fatores de crescimento e, a partir de modernas técnicas de laboratório, incluindo a tecnologia do DNA recombinante, tem sido possível, nos últimos anos, identificar vários fatores de crescimento, incluindo BMP, IGF-I e IGF-II, TGF- β , PDGF, BFGF e AFGF⁶⁴.

Para Hughes *et al*⁶⁵ o mecanismo de ação dos fatores de crescimento citados anteriormente está sendo amplamente estudado. O TGF- β pertence à superfamília das TGF- β e é sintetizado e encontrado no tecido ósseo, onde interage com receptores transmembrana serina/treonina quinase e tem importante papel no controle da proliferação e da diferenciação celular e na produção de matriz extracelular. Mas esse efeito depende do estágio da diferenciação celular. Nos estágios iniciais, o TGF- β recruta e estimula a proliferação das células osteoprogenitoras, mas, nos estágios tardios, o TGF- β bloqueia a diferenciação e à mineralização da matriz extracelular.

3.5.2 Plasma Rico em Plaquetas

Este fator foi descrito em 1979 por Castor *et al*⁶⁶ como sendo um peptídeo plaquetário, tendo uma ação mitogênica sobre as células do tecido conjuntivo e dos fibroblastos. É um importante regulador na proliferação e quimiotaxia de células-tronco. Proteína composta por dois genes distintos em duas correntes 28 e 31 kDA (Quilodalton – molecular peso) e liberado após a agregação plaquetária, estimula de imediato a migração de fibroblastos para a regeneração de feridas e perdas de substância tecidual. Também é secretado por macrófagos e estimula a síntese de colágeno.

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autólogo. Fundamenta-se na aceleração da cicatrização através da concentração dos fatores de crescimento⁴. Isto ocorre porque as células da medula óssea presentes no material de enxerto possuem receptores para os fatores de crescimento e a

presença do PRP reduz significativamente o tempo para a maturação e consolidação do enxerto, aumentando a densidade do trabeculado ósseo².

Sendo assim, o PRP é uma fonte autógena de múltiplos fatores de crescimento, isenta de características tóxicas ou imunorreativas e tem sido utilizado associado aos enxertos ósseos, para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica³. A cicatrização de fraturas ósseas são exemplos da capacidade regenerativa do tecido ósseo, graças à situação das células tronco e de sua ação progenitora (células osteoprogenitoras)⁶⁸.

Os fatores de crescimento são polipeptídios responsáveis por regular diversos eventos celulares, tais como, a síntese de DNA, a quimiotaxia, a citodiferenciação e síntese de matriz⁶⁹. Também contribuem para a regeneração óssea e o incremento vascular, característica vital para a cicatrização do enxerto ósseo⁷⁰, e assim parecem significar a chave para o entendimento e modulação dos processos cicatriciais⁷¹.

Estudos relatam que a quantidade acentuada de fatores de crescimento do PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que ocorreria, atualmente, através da área de coagulação no enxerto⁶. Eppley, Woodell, Higgins⁷² mostraram a quantidade de fatores de crescimento obtidos no concentrado de PRP em relação ao sangue. Concluíram que uma variedade de fatores de crescimento são detectados e liberados em níveis bem superiores no PRP. Com isso, sugeriram que o mesmo possa ser usado com grande valia na cicatrização tecidual de diversos tipos.

Gandhi *et al*⁷³ realizou um estudo em ratos diabéticos onde faziam uma fratura no fêmur e utilizavam o PRP transcutâneo para verificar se haveria benefício no reparo ósseo. Baseados nos resultados obtidos, os autores sugeriram que o PRP possa ser usado em casos de fraturas em pacientes com algum risco sistêmico que possa comprometer a cicatrização.

As plaquetas são fontes ricas de fatores de crescimento. Marx e Garg⁶⁷ descrevem que esses fatores atuam através da ligação específica a um receptor de membrana. Nesse momento, uma proteína transdutora de sinal intracitoplasmática é ativada, penetra no núcleo e ativa uma seqüência

genética específica para regulação celular, síntese de colágeno, produção óssea. Os autores explicam porque a aplicação exógena de fatores de crescimento, mesmo em altas concentrações, não pode produzir aberrações como hiperplasias, tumores benignos ou mesmo malignos. Fatores de crescimento não são mutagênicos, são proteínas naturais atuando sobre a regulação genética normal e no processo normal no mecanismo de cicatrização.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um experimento realizado em modelo animal.

4.1.2 Amostra

Foram utilizados 39 ratos da espécie Wistar-kyoto, isogênicos, pesando entre 200 e 250 g. Seis ratos machos foram utilizados como doadores da medula óssea e 33 ratas, fêmeas, utilizadas para o protocolo de intervenção.

O experimento foi realizado no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação

Para a realização deste trabalho houve etapas de preparação distintas, sendo elas:

a) seleção dos animais participantes da pesquisa sendo eles 6 machos e 33 fêmeas (descrição desta preparação está no item 4.2.2).

b) manutenção dos animais que, durante o período de acompanhamento dos mesmos, foram dispostos em gaiolas separadas e identificadas por nome do pesquisador, tratamento realizado e grupo de tratamento (descrição desta preparação está no item 4.2.3).

c) extração e preparação das células mononucleares e do PRP dos ratos machos para posterior aplicação no defeito crítico criado, nas ratas fêmeas (o protocolo completo cada extração e preparação estão descritos no item 4.2.4, respectivamente).

d) separação das ratas em três grupos distintos de tratamento distintos e criação do defeito crítico (o protocolo completo da formação destes grupos está descrito no item 4.2.5).

e) acompanhamento da lesão por imagens radiológicas nas semanas 6 e 10 de análise dos ratos (descrito item 4.2.6).

f) realização da eutanásia nas ratas para realização dos exames histológicos (descrita item 4.2.7).

g) avaliação da histologia pela técnica Picrosirius, (descrita no item 4.4)

h) identificação do DNA das células mononucleares, (descrita no item 4.3).

i) análise estatística, descrita no item 4.5.

j) aspectos éticos, descritos no item 4.6.

k) resultados, descritos no capítulo 5.

4.2.2 A seleção dos animais para a realização deste protocolo

Para a composição do grupo amostral foram utilizados 39 ratos da espécie Wistar-kyoto, isogênicos, pesando entre 200 e 250 g. Seis ratos,

machos, foram utilizados como doadores da medula óssea e 33 ratas, fêmeas, utilizadas para o protocolo de intervenção.

4.2.3 A manutenção dos animais para a realização deste protocolo

Os ratos foram adquiridos no biotério da PUCRS, dispostos em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libitum*. Foi respeitado o ciclo biológico claro/escuro de 12 horas. A manipulação dos animais foi realizada somente pelo pesquisador e pelo bioterista, em ambiente silencioso e com temperatura controlada (22 C).

4.2.4 Descrição dos fatores de crescimento utilizados neste protocolo e seus processos de extração

a) TGF- β 1 – Fator de Crescimento Transformador Beta 1 utilizado no protocolo

Este produto foi adquirido do Laboratório Biosource, com pureza de >98% e foi reconstituído com água destilada estéril até uma concentração de 50 μ g/mL. Foi utilizada uma concentração de 6 μ g/mL de TGF- β 1 em um volume adaptado de 30 μ L⁷⁴.

b) Extração PRP (Plasma Rico em Plaquetas) da artéria carótida de ratos machos, através de punção cardíaca

Foram utilizados 3 ratos da linhagem Wistar-Kyoto, oriundos do biotério do Laboratório de Habilidade Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, para extração do PRP, sendo um rato para cada grupo de análise.

Os ratos foram anestesiados, realizada a tricotomia em decúbito ventral, região da carótida. Para extração do PRP, foram colhidos 4mL de

sangue total obtido do rato por punção cardíaca⁷⁵, sendo distribuído em um frasco contendo Citrato de sódio a 3,2% (Vancuonet-USA) como anticoagulante. O protocolo baseou-se em duas centrifugações, sendo a primeira efetuada em uma centrífuga comum a 1.800 rpm, por 10 minutos, a uma aceleração de 200 G⁷⁶.

Obteve-se a separação das frações sangüíneas, na qual foi feita a remoção do plasma parte superior do tubo enquanto a fração com hemácias e leucócitos permaneceu na porção inferior. Após a separação da porção superior incluindo um pouco da zona de transição (Zona de Névoa), o material obtido foi acondicionado em outro tubo que foi centrifugado a 3.600rpm por 10 minutos a 400 G. Desta forma, todas as células depositaram-se no fundo do tubo (botão hemácias) ficando o plasma na porção superior do mesmo. A porção superior foi retirada deixando somente 400µL de PRP no interior do tubo que foi ressuspendido formando o plasma rico em plaquetas. A porção superior separada se constituiu no plasma pobre em plaquetas (PPP), porção plasmática do sangue, que contém poucas plaquetas⁷⁷.

Para finalizar a separação do PRP e garantir a confiabilidade de processo foi realizada a obtenção da trombina autógena. Esta foi obtida de 0,4mL de cloreto de cálcio a 10% do PRP obtido (400µL). A mistura foi mantida em banho-maria até obter a geleificação parcial. A seguir o conteúdo do tubo foi filtrado em gaze estéril para a separação da parte gelatinosa da líquida. Desta forma, aproximadamente 15µL foi obtido de cada tubo. Este líquido resultante foi trombina autógena promovida na coagulação.

A trombina autógena obtida (aproximadamente 15µL) foi adicionada ao PRP para a promoção do coágulo em fibrina. A mistura foi mantida em temperatura ambiente (aproximadamente 20°) até a geleificação total. Foi utilizado 30µL de PRP sobre cada defeito criado, Marx, 2004⁷⁷.

Foi realizado hemograma nas amostras de PRP, para avaliar a quantidade de plaquetas presentes nas amostras dos 3 ratos machos utilizados para os procedimentos dos tratamentos. Os mesmos foram

realizados no contador de células automatizado Coulter STKS, do Hospital São Lucas da PUCRS, conforme instruções do fabricante (Figura 1). Em cada amostra da alíquota de 150 μ L de PRP, apresentou os seguintes resultados:

Animal grupo 1 – plaquetas no PRP = 1.650.000	(1.650 10^3 / μ L)
Animal grupo 2 – plaquetas no PRP = 2.247.000	(2.247 10^3 / μ L)
Animal grupo 3 – plaquetas no PRP = 2.280.000	(2.280 10^3 / μ L)



Figura 1. Contador de células automatizado – HSL/PUCRS

c) Extração de células mononucleares da medula óssea de ratos machos

A extração das CMs da medula óssea do rato doador (1 rato macho para cada grupo do estudo) foi realizada após o sacrifício com superdosagem de Tiopental intracardíaca (2 ml, equivalente a 100 mg/kg de peso do rato). A obtenção da fração mononuclear da medula óssea foi realizada através da lavagem dos fêmures, tíbias, úmeros e ulnas dos

animais (Figura 2). Foi realizada a retirada dos ossos e posterior lavagem com solução DPBS (Gibco®, EUA). As epífises ósseas foram seccionadas. A extração do estroma medular foi obtida pela introdução de uma agulha 32G nas extremidades ósseas e posterior lavado interno com DPBS heparenizado. O conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm e ressuspenso em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco®, EUA). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade de 1.191g/L (Sigma-Aldrich®, EUA) a 400G durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain (azul tripan) 0,4% (Gibco®, USA), apresentando 99% de células viáveis. Para cada animal, foram separadas e administradas alíquotas de 30µL contendo 10⁶ células sobre o defeito criado.



Figura 2. Fêmures e tíbias utilizados para a coleta da Medula óssea

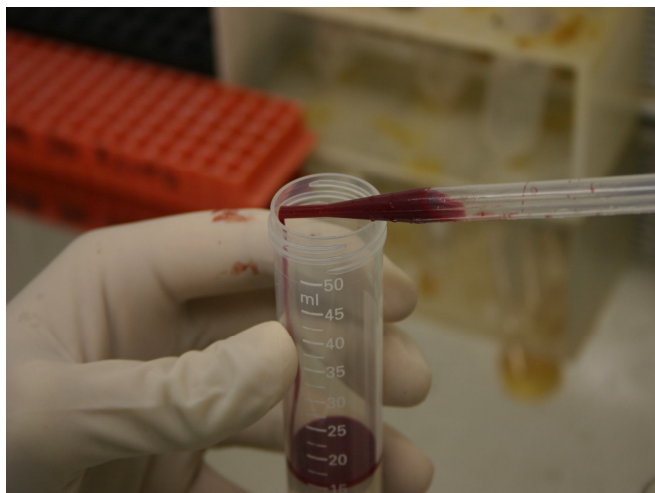


Figura 3. Separação da fração mononuclear do sangue da medula óssea por gradiente de densidade sobre Histopaque®.

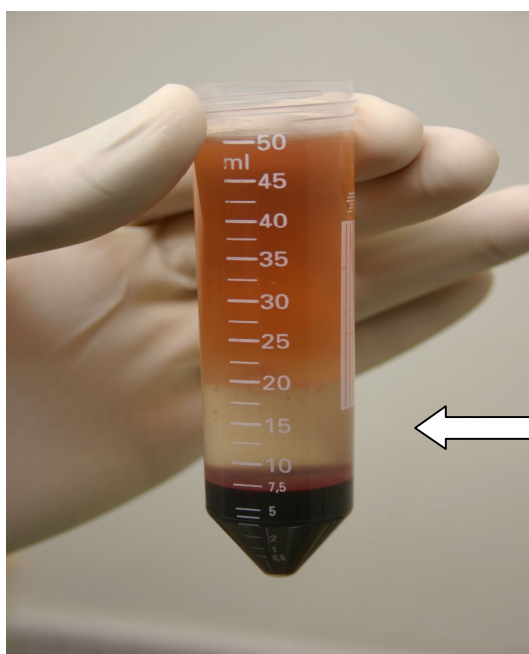


Figura 4. Fração mononuclear (anel que esta sob a fração mais clara) situada sobre Histopaque® após centrifugação

4.2.5 Protocolo de criação do defeito crítico

A indução anestésica foi realizada com o animal sob contenção e em decúbito dorsal. Os anestésicos foram aplicados por via intraperitoneal utilizando agulha e seringa de insulina. Foram administrados Cloridrato de Cetamina (80-100mg/mL associado à Cloridrato de Clorpromazina (1,6mg – 2mg/m por quilograma de peso do rato)⁷⁸.

Nesse estudo, foi criado um defeito crítico no fêmur bilateral. Todas as condutas foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e realizadas no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS.

Foram utilizados 33 ratos fêmeas adultas da linhagem Wistar-Kyoto pesando entre 200 e 250 gramas Estes foram divididos em 3 grupos com n = 11, sendo os procedimentos controle e tratamento no mesmo rato. Os animais foram devidamente anestesiados, conforme descrito anteriormente. Após ter-se certificado o efeito da anestesia, foi executada a tricotomia das patas traseiras.

Para o tratamento, os animais foram posicionados em decúbito lateral e efetuou-se uma incisão transversal, de aproximadamente 2 cm, com lâmina de bisturi Aço Carbono 15 (Feather Safety Razor Co, LTD), coxa direita e esquerda. Para exposição do fêmur, o músculo bíceps femural foi tracionado posteriormente enquanto o músculo glúteo máximo, tensor da fáscia lata e vasto lateral, foram tracionados anteriormente. Foi utilizado um afastador para expor o tecido ósseo (Figura 5).

Sucedeu-se o descolamento do perióstio com Descolador Freer 19 cm (Neumar).



Figura 5. Exposição do fêmur para execução da lesão

Uma broca Carbide haste longa nº8 foi conectada a um motor Odontológico de Suspensão Mini Beltec™ com alta rotação (rotação máxima de acionamento 15.000rpm) para perfurar o fêmur, enquanto o tecido era irrigado manualmente com solução salina e drenado com bomba Vácuo Aspiradora Nevoni™ por um auxiliar.

Foi criado um defeito crítico na cavidade da diáfise média, entre a linha áspera e o terceiro trocânter, com aproximadamente 5mm de comprimento por 2,5 mm de largura e com profundidade suficiente até chegar ao canal medular,⁵ para aplicação de células mononucleares e o mix de PRP/TGF- β no fêmur direito e no fêmur esquerdo solução salina (Figura 6).



Figura 6. Defeito crítico de 5mm de largura por 2,5mm de largura, usando broca Carbide haste longa n°8

As amostras para aplicação nos sítios defeituosos dos fêmures foram definidas de forma que cada rata teve dois defeitos críticos gerados, um em cada fêmur. O defeito crítico do lado esquerdo não recebeu tratamento específico além de solução salina, sendo definido como grupo controle. Foram então, utilizadas 11 ratas para a formação deste controle para cada tratamento estudado. Os tratamentos foram restritos aos membros direitos, sendo que cada tratamento gerou um grupo de estudo:

- Grupo 1 – utilização de 30µL CMs com 30µL fator de crescimento transformador Beta (TGF-β);
- Grupo 2 – utilização de 30µL CMs com 30µL PRP (plasma rico em plaquetas).
- Grupo 3 – utilização de 30µL CMs com 30µL fator de crescimento transformador Beta (TGF-β) e 30µL PRP (plasma rico em plaquetas);

Seguiu-se a sutura simples com porta-agulha Mayo-Hegar com ponta de Videa e fio de mononylon Ethilon nº 5 da Ethicon™. A sutura foi realizada respeitando-se os planos das estruturas. Primeiramente foi reaproximado o perióstio, seguido da união das camadas musculares e, por fim, a do tecido cutâneo. No lado esquerdo foi realizado o mesmo procedimento de sutura.

No pós-operatório, nas primeiras 24 horas foram utilizados como analgesia Ketoprofen 5mg/kg de peso subcutânea⁷⁹. Após 48 horas foi utilizado paracetamol 200mg/mL como analgesia com dose de 1mL/20mL de H₂O (água), equivalente a uma dose de 125 a 150mg de paracetamol/dia.

4.2.6 Exames Radiográficos para acompanhamento do crescimento das lesões

Para a realização das imagens foi selecionado o equipamento mamográfico Mamomat 3000 da marca Siemens (Figura 7), com aquisição tipo em tecnologia FUJI CR. Foram utilizados transdutores de imagens *Image Plate* (IP) da FUJI específicos para mamografia. A tecnologia aplicada à mamografia foi selecionada dada as características de tamanho dos ratos e contraste da imagem para posterior análise. Para a leitura das imagens foi utilizado o FCR Profect CS da marca FUJI, modelo CR-IR 363.



Figura 7. Aparelho Mamografia Mammomat 3000/HSL

A técnica radiográfica utilizada consistiu em uma combinação alvo-filtro de Mo-Mo, tensão aceleradora de tubo de 28kVp e carga transportada pelo tubo de 14mAs (técnica mais adequada para imageamento da lesão fêmur destes animais). Para a realização da coleta de dados cada rato foi colocado na posição central da área de irradiação em posição decúbito ventral, conforme ilustra a Figura 8. Após a leitura dos IP, as imagens foram salvas em formato DICOM, sendo identificado o grupo e o número do animal em cada coleta, bem como a semana de tratamento (se sexta ou se décima).



Figura 8. Posição rato decúbito ventral aparelho Mammomat 3000

Para a realização da análise das imagens radiográficas um Procedimento Operacional Padrão (doravante denominado POP) foi desenvolvido. O POP pode ser observado no Anexo C. Esse foi desenvolvido com o intuito de garantir a repetibilidade do processo de análise das imagens, conforme figura 9.



Figura 9. Imagem do animal em decúbito ventral indicando a área do defeito crítico criado (POP)

4.2.7 Eutanásia

A eutanásia foi realizada após período de 6 e 10 semanas, sob anestesia de Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Clorpromazina, seguido de superdosagem de Tiopental intracardíaca de 2 mL equivalente a 100 mg/kg de peso do rato. Após o óbito e a remoção do fêmur para histologia, os animais foram desprezados em lixo hospitalar.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS MONONUCLEARES

4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com fenol/clorofórmio baseado no método descrito por Isola *et al*⁸⁰. O material coletado foi macerado nos microtubos contendo os 300µL do tampão PBS. Foram adicionados 600µL de Brazol (LGC Biotecnologia[®]) e 120µL de clorofórmio, o conteúdo foi homogeneizado utilizando vortex (Genie[™]) e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5417C[™]). O sobrenadante foi preservado e adicionado a ele 70% de seu volume de álcool isopropílico. O conteúdo foi ressuspenso e armazenado a -20°C *overnight*. O material foi novamente centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi ressuspenso em 20µL de água ultra pura. As amostras tiveram o DNA quantificado em espectrofotômetro e apresentaram resultados entre EMTO 700[®].

4.3.2 Análise Molecular - PCR

Para a identificação das células administradas nas lesões foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica foi idealizada por Kary Mullis⁸¹ e permite a amplificação de uma região

específica do DNA, que pode ser visualizada através da análise por eletroforese em gel de agarose⁸². A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research™) empregando *primers* complementares a seqüência de DNA do gene TSPY, localizado em uma região do cromossomo Y de *Rattus norvegicus*.

Como controle positivo de cada reação, foram ensaiados juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, amostras de DNA obtidas a partir da extração de tecido ósseo de ratos machos. Os *primers* específicos para o gene TSPY foram desenhados de modo a amplificar especificamente o gene desejado, com cuidado para não amplificar regiões homólogas, o que foi confirmado através de alinhamento junto ao banco de dados do Blast, no website do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

As condições para a reação da PCR os *primers* e a concentração dos reagentes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados, reagentes e condições de amplificação.

Primers	Reagentes	Condições de PCR
F - 5'- agaggctacatcaccctga -3"	36µL - H2O	95°C - 5 min.
R - 5'- gcgcattttggcacttttgc -3"	5µL – Tampão (10x)	95°C - 1 min.
	1,5µL - MgCl ₂ (1,5mM)	52°C - 40 seg.
	2µL - dNTP (200µM)	72°C - 30 seg
	1µL- Pf (10pmol)	72°C - 5 min
	1µLPr - (10pmol)	4°C - Manutenção
	0,5µL - Taq (2,5U)}	
	5µL - DNA	

Os produtos gerados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio em tampão TAE 1x por 30 minutos aplicando uma voltagem de 100 V e uma amperagem de 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta (3UV™) e as imagens foram capturadas dos géis de agarose resultantes do trabalho,

utilizando equipamento de foto-documentação através do programa Quantity One™. O produto de amplificação da PCR utilizando os *primers* complementares à seqüência do gene TSPY gera um fragmento de 346 pares de base (pb).

4.4 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA POR TÉCNICA DE PICROSIRIUS

4.4.1 Coloração Picrosirius

Para avaliação histológica utilizou-se a técnica de coloração picrosirius, que constitui em um método histoquímico específico para a percepção de estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas⁸³. A coloração pelo método de picrosirius faz com que grande quantidade de moléculas do *Sirius red*, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas à luz polarizada. A matriz orgânica abrange 90% de colágeno tipo I em sua composição⁸⁴.

4.4.2 Técnica de coloração

Os fêmures foram descalcificados com ácido fórmico 5% em DPBS (GIBCO™ U.S.A) O material desidratado foi embebido em parafina utilizando a estação LEICA TP 1020™ (LEICA, JAPAN) . Os fêmures foram emblocados em parafina e realizou-se cortes de 5µm na altura da lesão utilizando micrometro OLYMPUS CUT 4060™ (OLYMPUS,JAPAN). O material foi colocado em estufa à 60°C por 24 horas, após, foram desparafinizadas (xilol 2X por 5 minutos, álcool absoluto – 4X por 2 minutos) e hidratadas em água corrente. Em seguida foi realizada a incubação em solução de picrosirius à 1% durante uma hora seguido de lavagem em água corrente por 20 minutos. As lâminas foram desidratadas e montadas com bálsamo de Canadá. As lâminas foram codificadas para posteriormente serem fotografadas e analisadas.

4.4.3 Análise das imagens - Histomorfometria

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus com uma objetiva de 5X. Para a captura das imagens utilizou-se a câmara Coo1SNAP™ *cf* (Media Cybernetics, Inc.), do Laboratório de Patologia do HSL/PUCRS, acoplada ao microscópio e a um computador, produzindo um aumento similar a uma objetiva de 10X. Com isto, as imagens resultantes passaram a ter um aumento de 50X. Cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada, para posterior diferenciação e quantificação da área com a presença de colágeno. Foram selecionados, manualmente, dois campos por lâmina representando toda a área da lesão. Para cada área da lesão foi eleita, na mesma lâmina, uma região adjacente ao defeito com dimensões semelhantes, representando o osso normal (100% de neoformação óssea).

Após o registro das imagens, as mesmas foram analisadas através do software Image Pro-Plus 6.1® (Media Cybernetics, Inc.), o qual permitiu através de uma contagem de pixels, registro automático, mensurar a área em micrômetros correspondente a cada defeito e ao osso normal. Para diferenciar o colágeno, foi obtida a medida da razão do tecido birrefringente por unidade de tecido (pixel/ μm), utilizando as imagens capturadas com a luz normal e luz polarizada, conforme ilustram as Figuras 10 e 11. A área em micrômetro foi transformada em porcentagem de neoformação através da comparação entre a área de tecido ósseo da lesão e a área de tecido ósseo normal da região adjacente, sendo esta estipulada como 100% de neoformação (ideal).

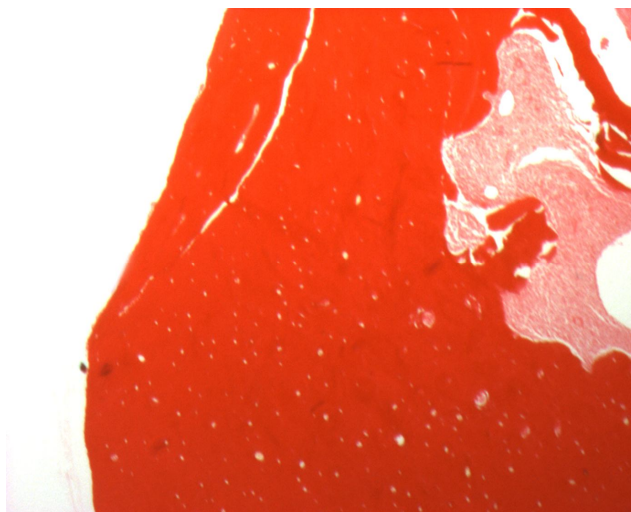


Figura 10. Fotografia lâmina osso normal adjacente ao tratamento com coloração picosirius

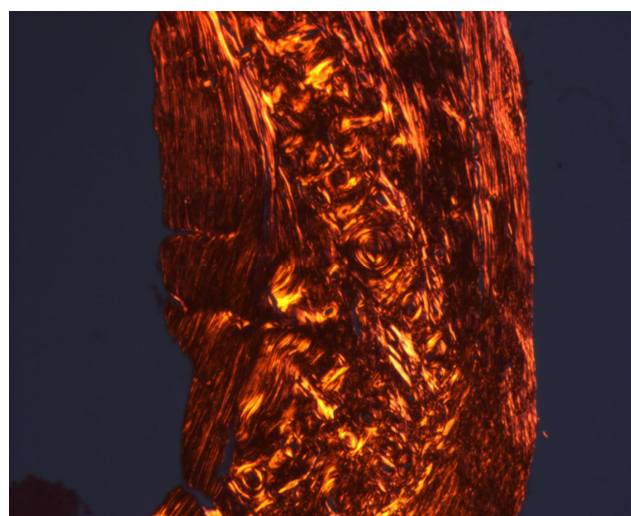


Figura 11. Fotografia lâmina polarizada osso com lesão

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das imagens do RX, utilizando o Procedimento Operacional Padrão (POP), foram submetidos à análise de variância ANOVA (uma via). A comparação dos tempos foi realizada pelo teste t de student. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ como diferença estatística e poder estatístico de 95%. Os dados foram analisados no programa *Statistical Package for Social Sciences* - SPSS 14.0

Os dados obtidos tanto para análises de Rx e histologia foram digitados em uma planilha eletrônica (Microsoft Office Excel 2003®).

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o protocolo de pesquisa nº 08/00044 (Anexo A). A pesquisa foi realizada com base nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Também seguiu a Lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para uso científico de animais.

5 RESULTADOS

5.1 REPARO POR IMAGENS

Avaliação do reparo no defeito crítico, utilizando imagens geradas por radiação, mostrou apresentar um fechamento positivo da lesão para todos os casos estudados, porém não foi possível encontrar diferença significativa entre os tratamentos ou entre o tratamento e o caso controle. Somente limiares significativos foram atingidos para os grupos estudados.

5.2 AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA – RESULTADOS DOS GRÁFICOS

A avaliação radiológica realizada no período pós-operatório entre 6 e 10 semanas mostrou diferentes resultados entre os três grupos de tratamento.

Como se pode observar nos gráficos das Figuras 12 e 13, tanto para o comprimento longitudinal da lesão quanto para a área da lesão houve a constatação de fechamento da mesma, tanto para o grupo controle quanto para o tratado em todos os tratamentos.

Observou-se na maior parte dos dados que o valor médio \pm DP calculado não engloba todo o conjunto de dados avaliados, o que demonstra uma grande flutuação dos dados para a metodologia proposta.

Na Figura 12, observou-se que para os grupos CMs, TGF- β /CMs e PRP não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa, visto que

a barras de erro relacionadas ao valores médios acabam se cruzando para os casos intra-grupos estudados. Existe uma indicação para estes grupos de que o tratamento é uma opção melhor do que o controle.

O mesmo comportamento foi verificado para análise apresentada nos gráficos da Figura 13, considerando o comprimento da lesão, que o desempenho não esperado do grupo CMs + PRP + TGF- β pode ser explicado com base no relato de Santana, I.S., 2006.

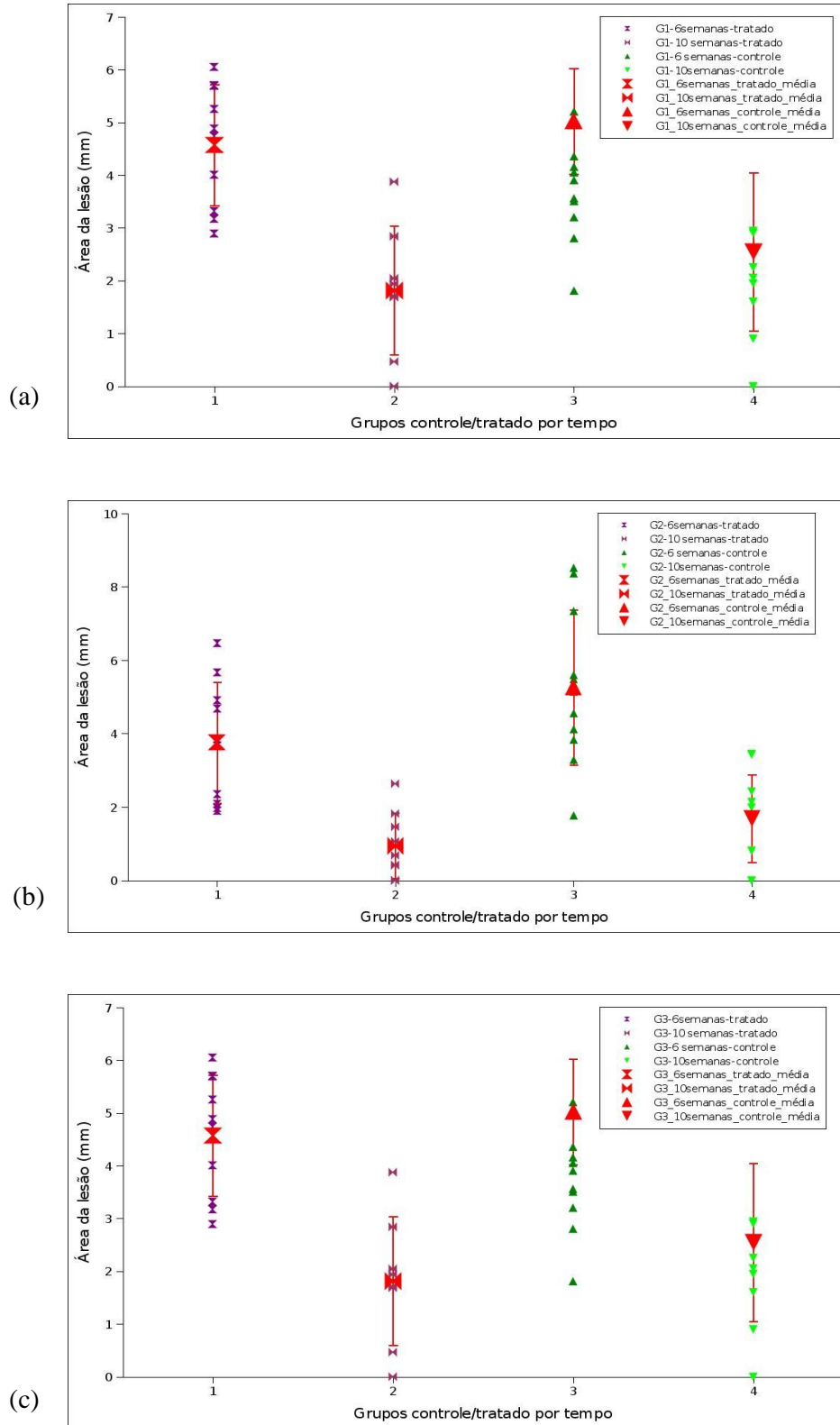


Figura 12. Gráficos da evolução do fechamento da área da lesão para 6 e 10 semanas dos grupos controle e tratado e seus respectivos valores médios e desvios padrões para (a) grupo CMs+ TGF-β, (b) grupo CMs + PRP e (c) grupo CMs + PRP + TGFβ.

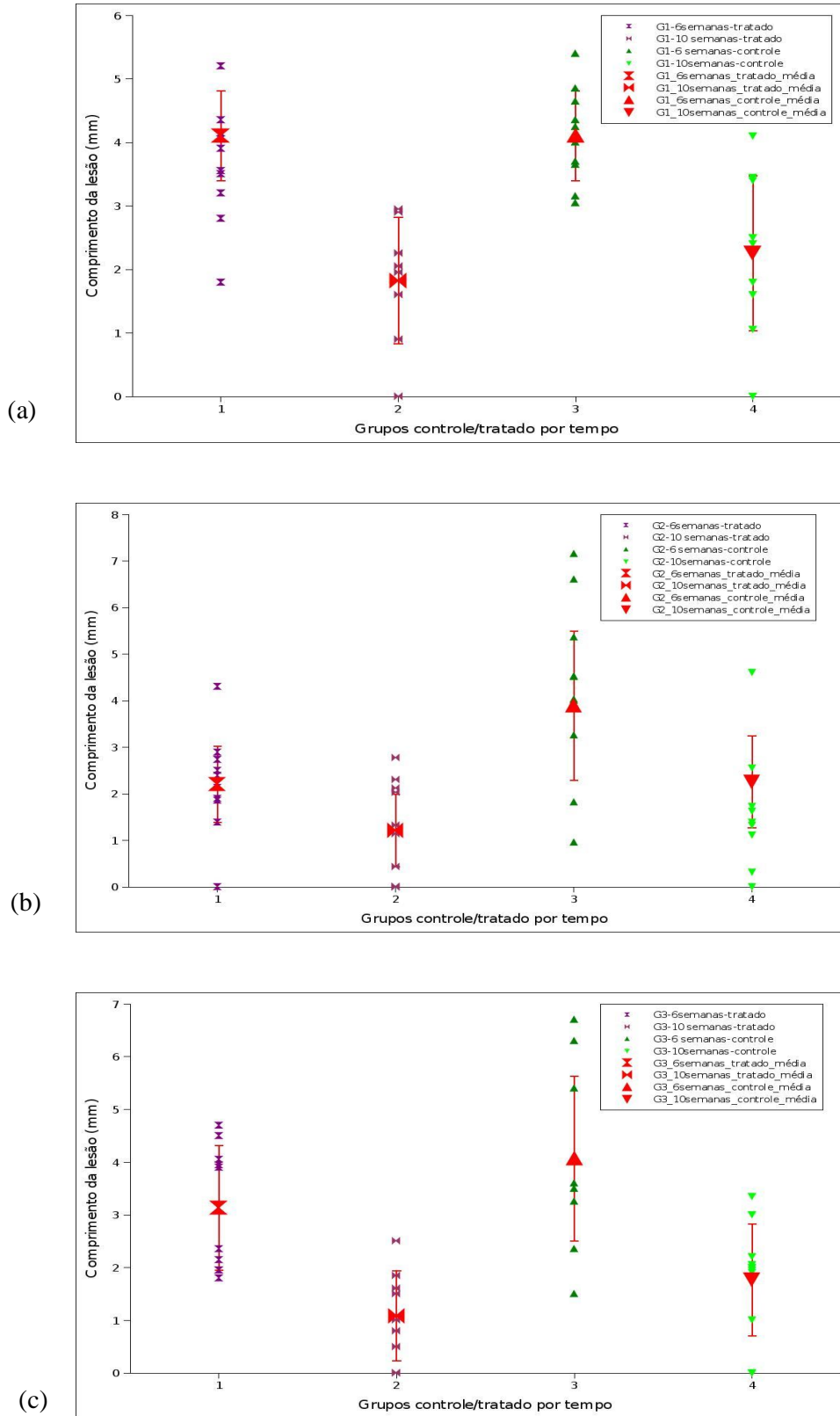


Figura 13. Gráficos da evolução do comprimento da lesão para 6 e 10 semanas dos grupos controle e tratado e seus respectivos valores médios e desvios padrões para (a) grupo CMs+TGFβ, (b) CMs+PRP e (c) CMs + PRP + TGFβ.

Entretanto o grupo 3, com tratamento CMs + PRP + TGF- β , apresentou um comportamento anômalo com relação dos demais grupos na intracomparação entre o grupo tratado e grupo controle, onde o grupo tratado apresentou pior desempenho do que o controle. Desta forma, existe forte indicação de que este tratamento não seja a melhor opção para estimulação do reparo ósseo. Os gráficos apresentados nas Figuras 14 e 15 mostraram que a taxa de redução da área e do comprimento da lesão entre os grupos controles e tratados intercomparando-os em função do tempo.

Para os grupos 1, CMs + TGF- β , e 2, CMs + PRP, os valores médios da taxa de redução ficou em 17,2% pp e 12,7% pp, respectivamente. Isso indica que, para estes grupos, o tratamento auxiliou no fechamento da lesão criada. O grupo 1, CMs + TGF- β apresentou uma taxa de redução de 62% melhor no tratado do que no controle. O grupo 2, CMs + PRP, apresentou melhor desempenho na taxa de redução, sendo 66% mais acentuado no tratamento do que no controle. Esses percentuais indicam que não há diferença significativa entre estes métodos propostos.

Nos gráficos da Figura 1 observou-se uma taxa de redução negativa significativa para o grupo 3, com tratamento CMs + PRP + TGF- β , o que evidencia o comportamento de fechamento melhor para o grupo controle. Este grupo apresentou a taxa média de redução da área da lesão de -18,6 % pp (pontos percentuais). O grupo 3, CMs + PRP + TGF- β apresentou uma taxa de redução de 66% melhor no controle do que no tratamento, o que sinaliza que efetivamente inibe o reparo ósseo.

Observa-se o mesmo comportamento quanto ao comprimento da lesão onde grupo 1 e 2 apresentaram em média 9,8% e 12,3% de redução desta dimensão respectivamente. Já o grupo 3 mostrou -10,6% de reparo ósseo na lesão, quando são intercomparados controle com tratado.

Além disso, a média de taxa de redução para os três grupos foi de aproximadamente 0,923%, o que não evidencia a existência de significância estatística entre o grupo controle e tratado.

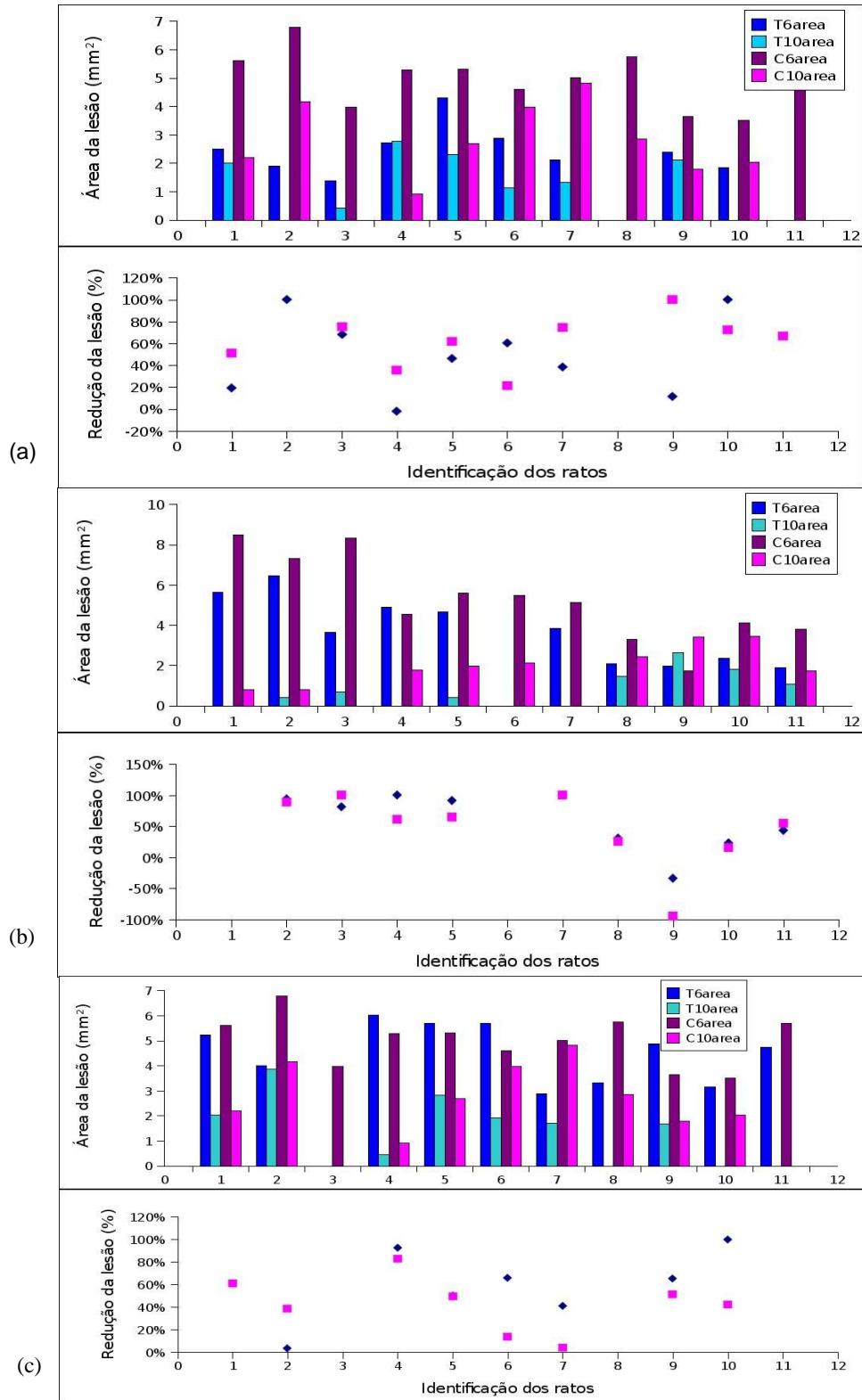


Figura 14. Gráficos da taxa de redução da área na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF-β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF-β. A cor rosa indica grupo Controle e a cor azul indica grupo Tratado.

A Figura 15 evidencia a intercomparação entre a redução em função do tempo para cada para de análise controle-tratado.

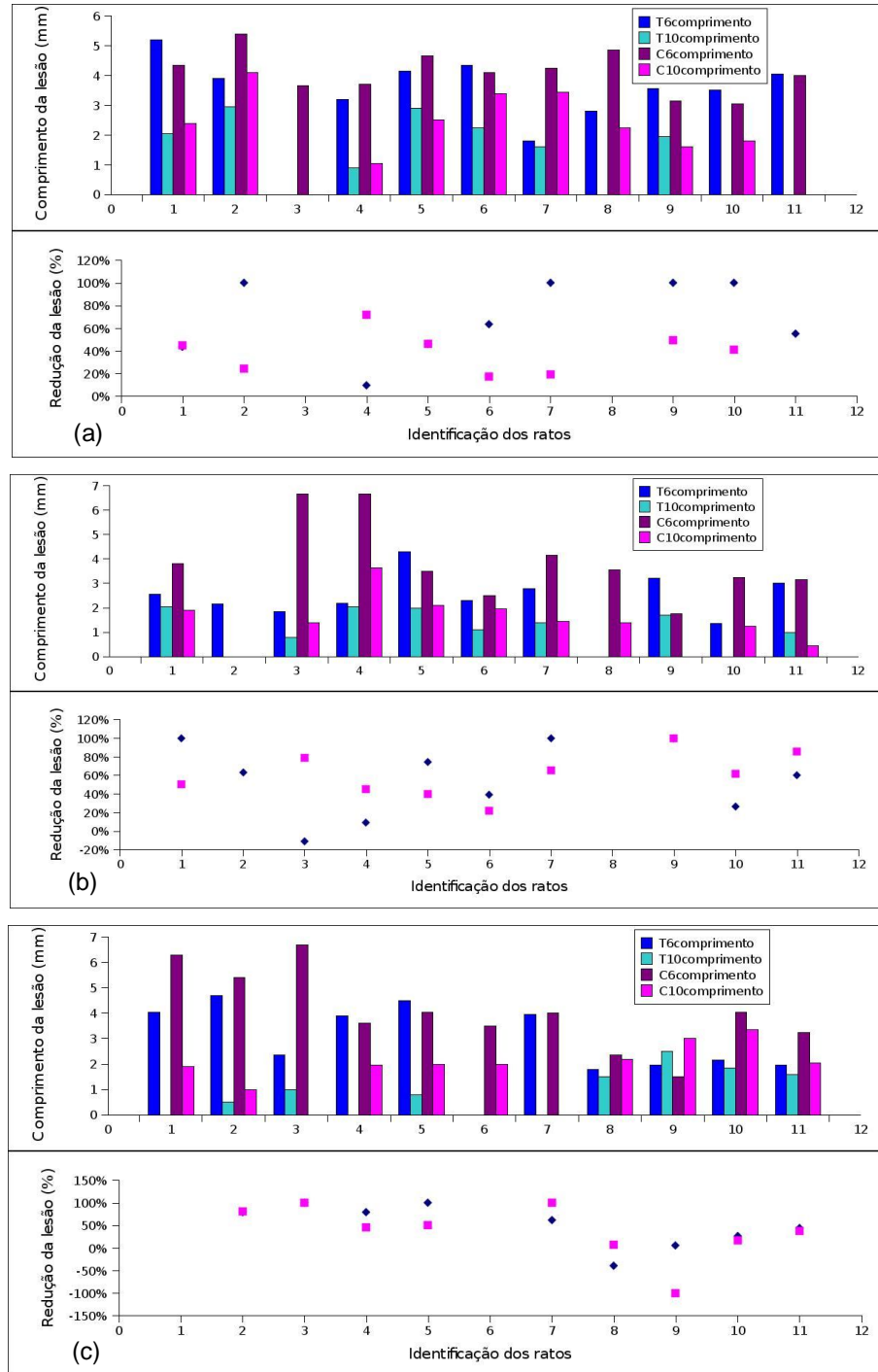


Figura 15. Gráficos da taxa de redução de comprimento na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF-β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF-β. A cor rosa indica grupo Controle e a cor azul indica grupo Tratado.

Na figura 15 (a), grupo 1, CMs + TGF- β observou-se que dos 9 animais do estudo, 6 apresentaram um fechamento do defeito crítico maior no fêmur tratado do que no fêmur controle. Neste grupo tivemos dois animais com fraturas de fêmur, nos quais foi excluído do estudo.

Na figura 15 (b), grupo 2, CMs + PRP observou-se que dos 10 animais do estudo, 5 apresentaram um fechamento do defeito crítico maior no grupo controle. Neste grupo tivemos 1 animal com fratura de fêmur, no qual foi excluído do estudo.

Na figura 15 (c), grupo 3, CMs + PRP + TGF- β observou-se que dos 9 animais do estudo, 2 animais apresentaram um fechamento maior no grupo controle, sendo que 4 animais apresentaram o mesmo resultado no fechamento do defeito crítico. Este grupo apresentou o pior resultado comparando par a par. Neste grupo tivemos 2 animais com fratura de fêmur, os quais foram excluídos do estudo.

De forma geral, este gráfico mostra fêmur controle e tratado em função do tempo e a taxa de redução do grupo controle e tratado.

5.3 ADESÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

A presença e conseqüente adesão das células mononucleares administradas nos animais tratados não foram evidenciadas através de técnica de PCR utilizando *primers* complementares a seqüência do gene TSPY como marcador.

5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA PELA TÉCNICA DE PICROSIRIUS

Os resultados da avaliação foram feitas em um grupo amostral de animais por grupo após 10 semanas pós-operatório, haja visto que houveram mortes de animais, falhas e perdas de lâminas, não tendo com isto condições de as mesmas serem analisadas, por este motivo foram excluídos do estudo, conforme tabela 2. A avaliação destas lâminas histológicas evidenciou neoformação óssea, com a presença de colágeno tanto para grupo controle, como no tratamento.

Tabela 2. Distribuição de animais por grupo, perdas e áreas de tratamento analisadas

Análise 10 semanas pós-operatório para todos os grupos:

Grupo	Área inicialmente tratada	n° e causas de perdas	Áreas analisadas
1	11	2 fraturas fêmur 5 problemas de descalcificação e confecção de lâminas	4
2	11	1 fratura fêmur 7 mortes de animais pós Análise 10 semanas Rx.	3
3	11	2 fratura de fêmur 5 mortes de animais pós Análise 10 semanas Rx 3 problemas de descalcificação e confecção De lâminas	1
TOTAL			9

Com o auxílio do programa Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Inc.), foi selecionada a área correspondente ao osso de cada imagem. Tendo sido a área óssea da imagem – tecido ósseo normal estipulada como 100% de neoformação (ideal) a ser buscada, foi calculada a porcentagem da neoformação de osso da área tratada em comparação com os mesmos (figuras 16a - 24a – luz normal e de 16b a 24b luz polarizada, abaixo relacionadas)

Os resultados da análise histológica para os grupos CMs + TGF- β e CMs + PRP não apresentaram diferenças na porcentagem de formação de colágeno conforme demonstra a figura 25. (a;b;c;d;e;f). Não foi possível realizar análise do grupo 3 CMs + TGF- β + PRP por apresentar dados somente de um animal.

GRUPO 1 – CMs + TGF- β

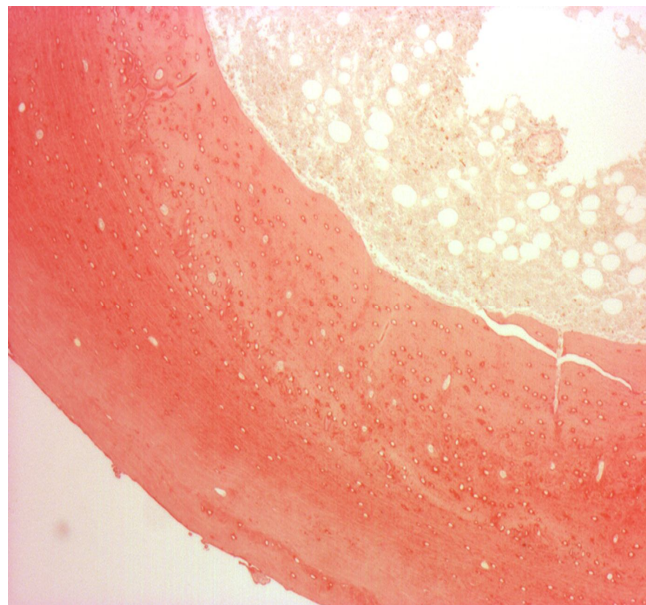


Figura 16(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X

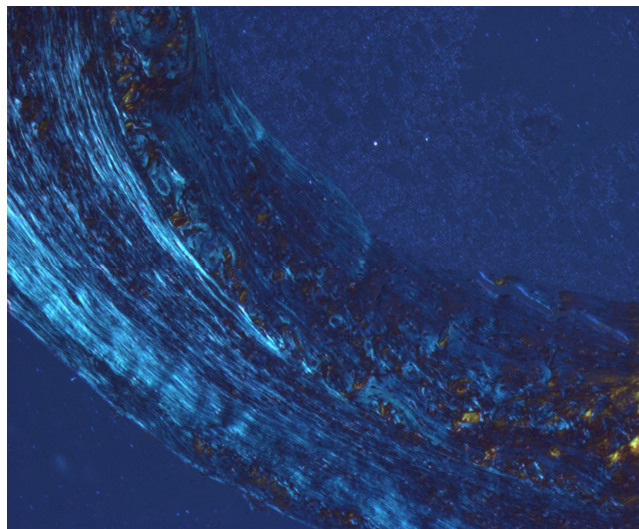


Figura 16(b). Fotografia de lâmina histológica polarizada com picrosirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão. Aumento 50X.

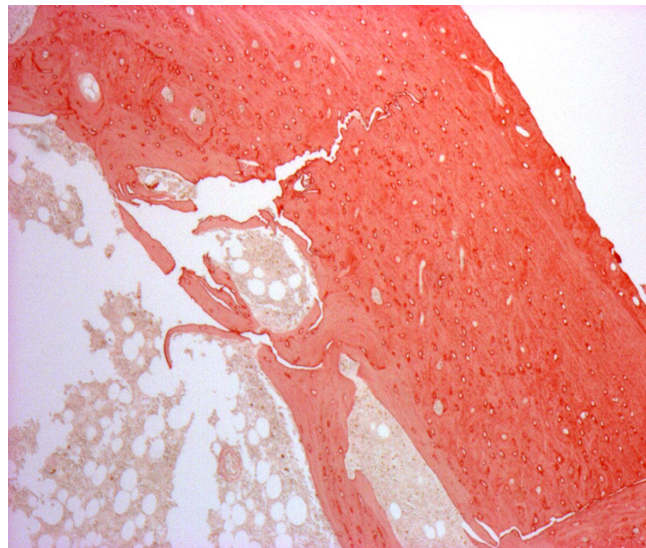


Figura 17(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + TGF- β . Aumento 50X.

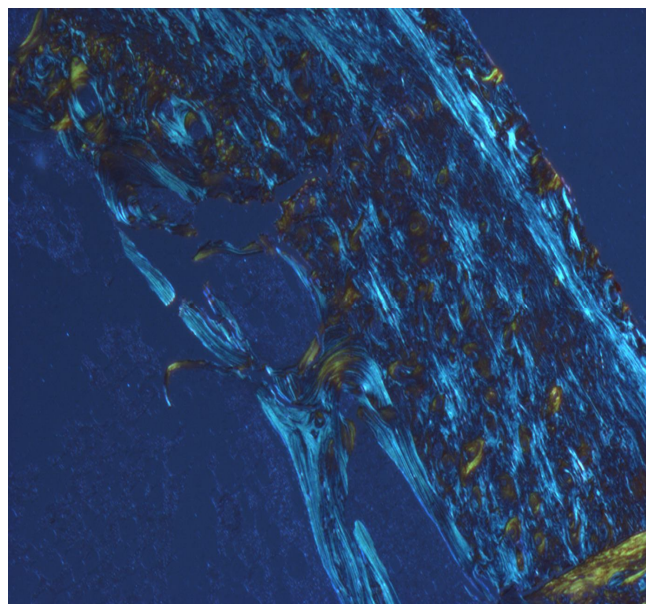


Figura 17(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + TGF- β . Aumento 50X.

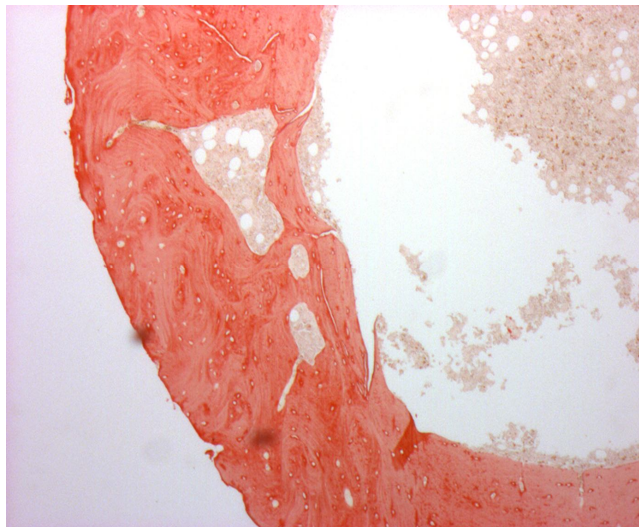


Figura 18(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + TGF- β . Aumento 50X.

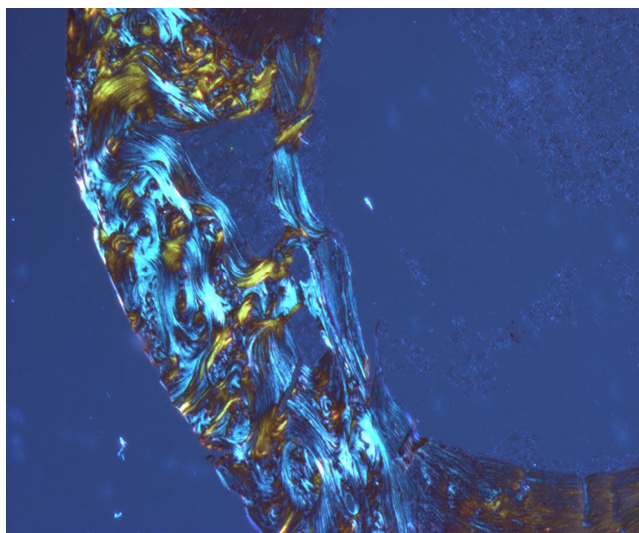


Figura 18(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + TGF- β . Aumento 50X.

GRUPO 2 – CMs + PRP

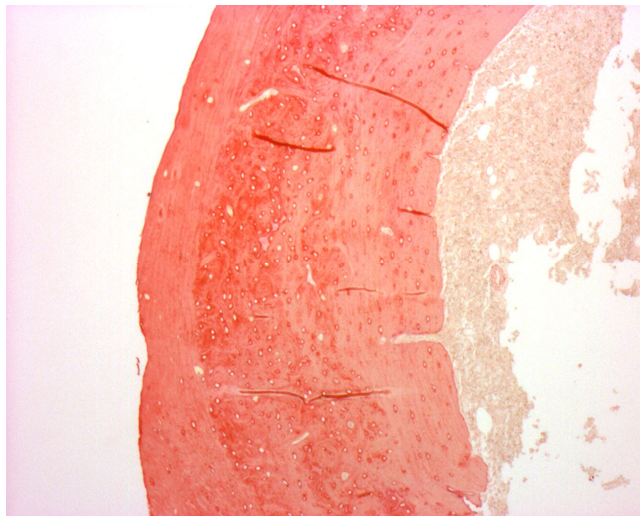


Figura 19(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X.

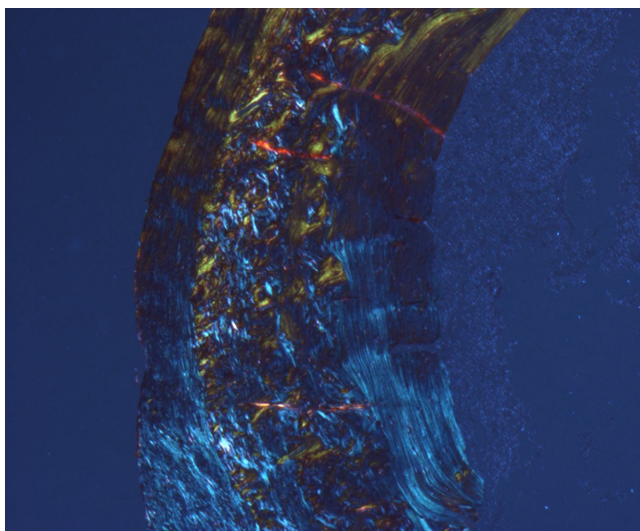


Figura 19(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picosirius polarizada, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão. Aumento 50X.

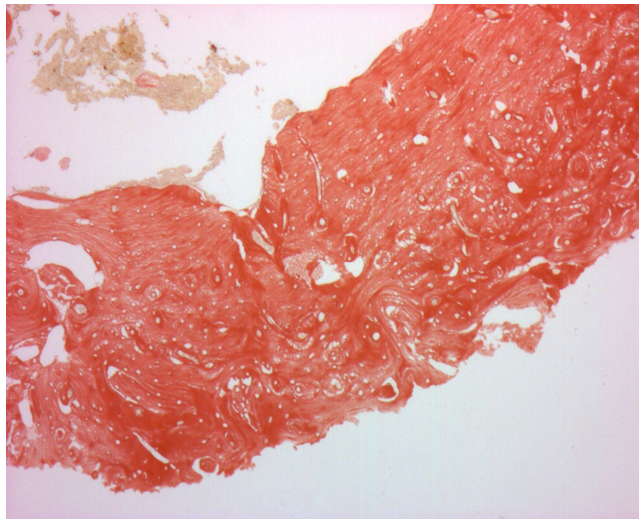


Figura 20(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP. Aumento 50X.

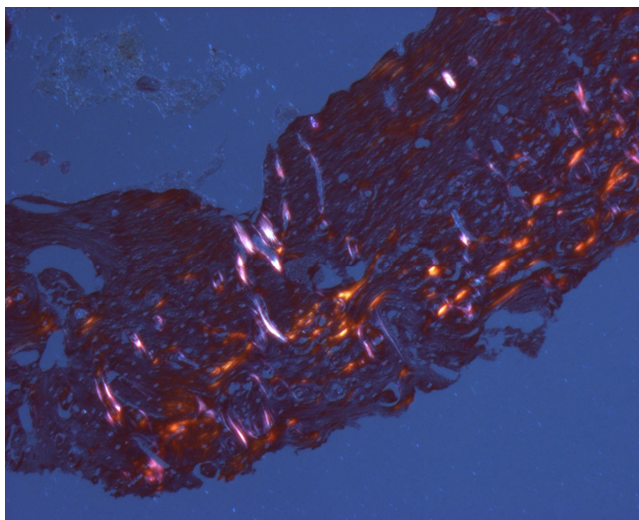


Figura 20(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP. Aumento 50X.

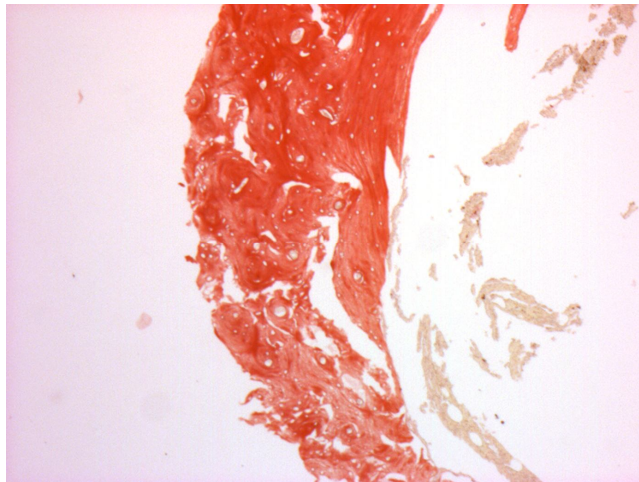


Figura 21(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP. Aumento 50X.

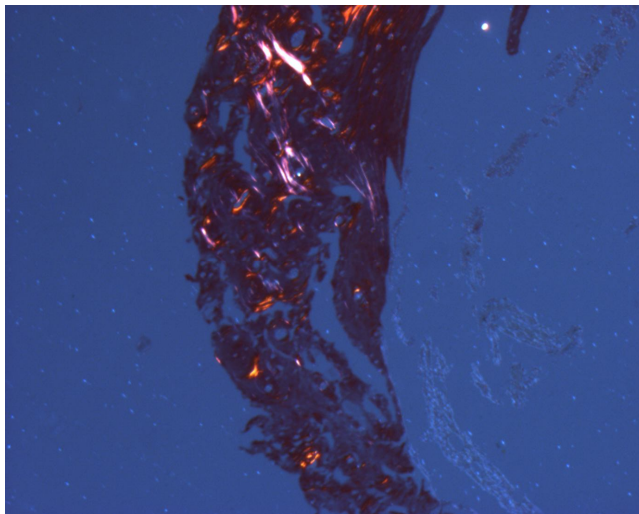


Figura 21(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP. Aumento 50X.

GRUPO 3 – CMs + PRP +TGF- β

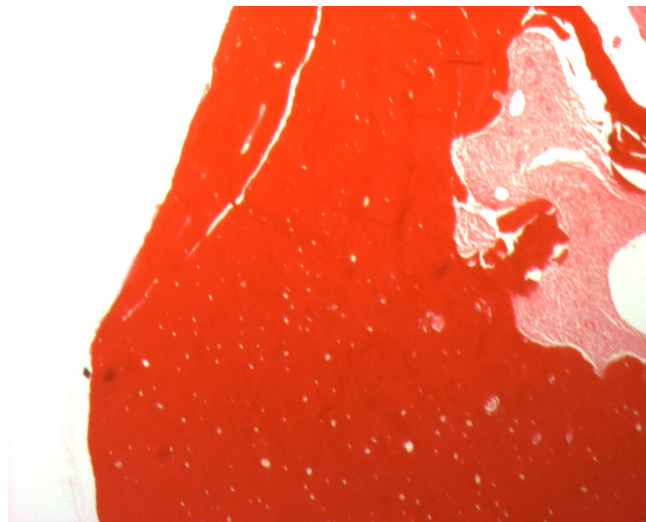


Figura 22(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente a lesão. Aumento 50X.

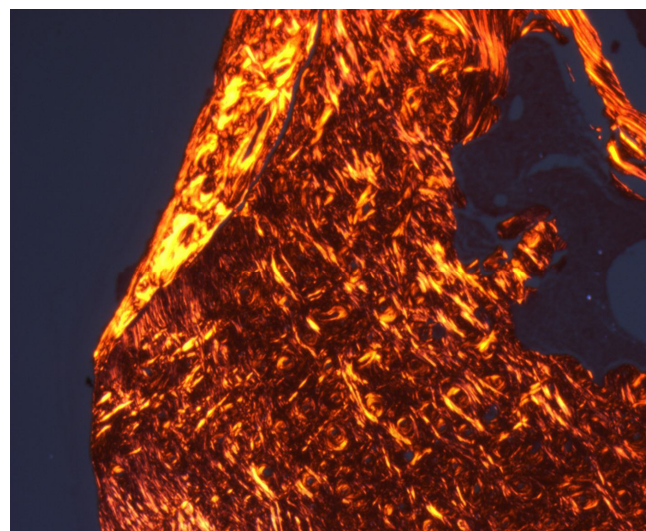


Figura 22(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato (osso normal), área adjacente da lesão. Aumento 50X.



Figura 23(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X.

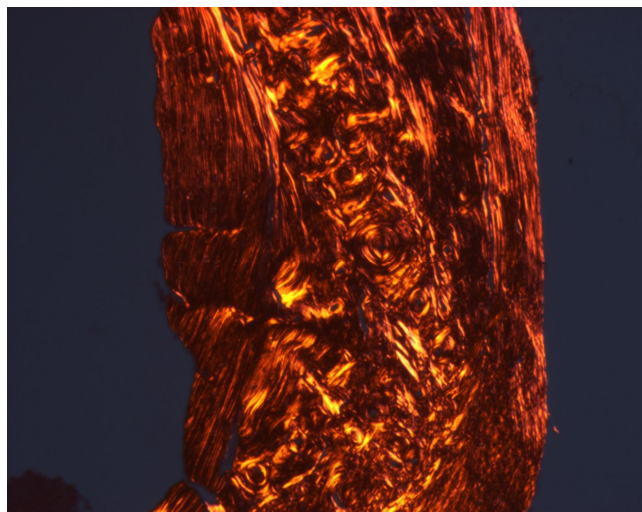


Figura 23(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X.

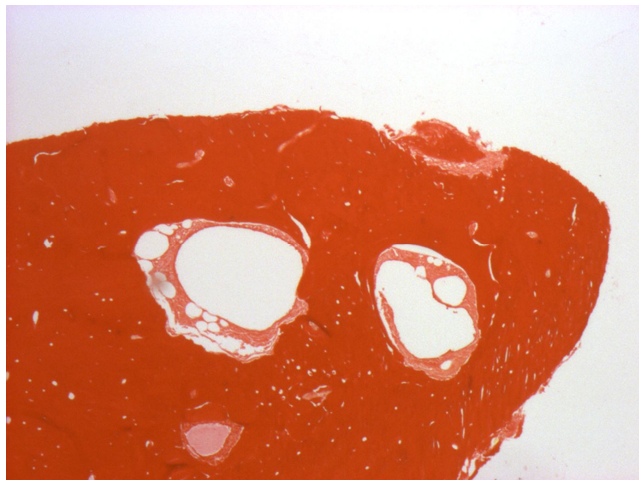


Figura 24(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X.

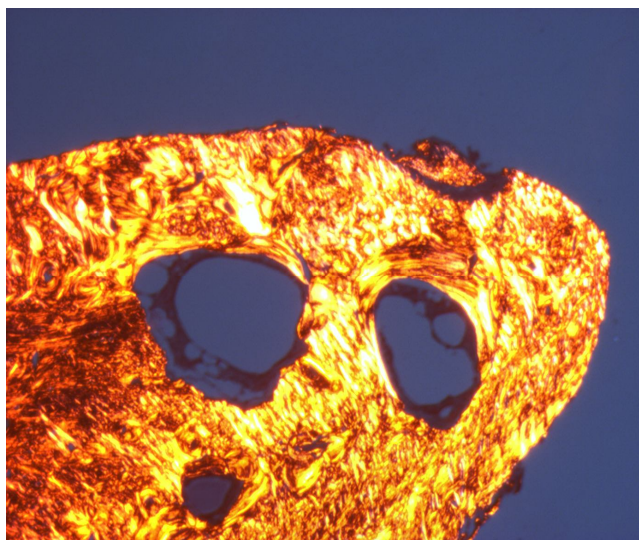
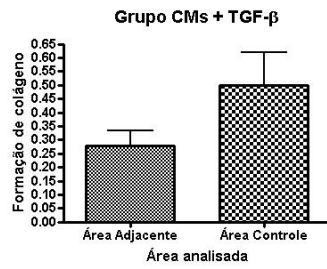
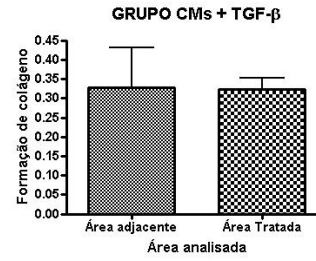


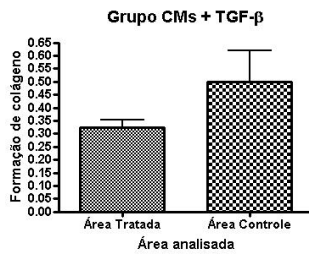
Figura 24(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + PRP + TGF- β . Aumento 50X.



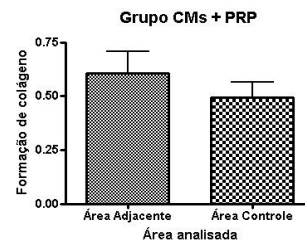
(a)



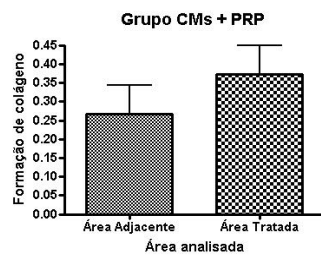
(b)



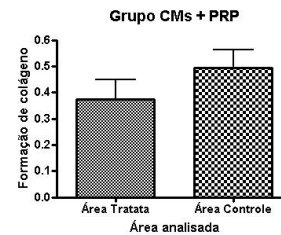
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 25. : Gráficos de avaliação neoformação óssea com técnica picosirius

- (a) Grupo CMs + TGF-β - Área adjacente X Área Controle p=0,172
- (b) Grupo CMs + TGF-β - Área adjacente X Área Tratada p=0,967
- (c) Grupo CMs + TGF-β - Área Tratada X Área Controle p= 0,228
- (d) Grupo CMs + PRP - Área adjacente X Área Controle p= 0,398
- (e) Grupo CMs + PRP - Área adjacente X Área Tratada p=0,378
- (f) Grupo CMs + PRP - Área Tratada X Área Controle p=0,296

Observa-se que a figura 25 (a) representa o grupo CMs + TGF- β relacionando a área adjacente ao controle. O mesmo apresentou uma formação de colágeno maior na área controle, com $p=0,172$. Já na figura 25 (b) do mesmo grupo, apresentou uma formação de colágeno muito próxima entre a área adjacente e a área tratada, sendo $p=0,967$, não sendo significativo o percentual entre as áreas. Analisando a área tratada em relação ao controle, conforme mostra a figura 25 (c), observamos que a formação de colágeno no tratado foi menor em relação ao controle com $p=0,228$.

A mesma análise foi feita no grupo CMs + PRP. Como mostra a figura 25 (d), relacionando área adjacente e área controle, o mesmo mostrou que a formação de colágeno foi menor em relação a área adjacente com $p=0,398$. Já na figura 25 (e) do mesmo grupo, relacionando área adjacente e área tratada, a formação de colágeno foi maior na área tratada com $p=0,378$. Na figura 25 (f) mostra a relação entre a área tratada e área controle, sendo que a área controle teve uma formação maior de colágeno com $p=0,296$.

Os resultados das análises histológicas indicam que tanto para o grupo tratado como para o grupo controle houve formação de colágeno evidenciado neoformação óssea. Porém, não houve diferença entre os tratamentos propostos.

6 DISCUSSÃO

Segundo Rose *et al.*, a medicina regenerativa compõe uma nova área que investiga técnicas de regeneração tecidual a partir de marcadores naturais (fatores de crescimento) e componentes do próprio organismo (células tronco).

A fratura proximal de fêmur contribui consideravelmente para a morbidade e mortalidade principalmente em idosos, devido à doenças pré-existentes e a complicações resultantes ao confinamento. Estudos recentes com células tronco têm demonstrado grande capacidade de regeneração tecidual óssea, primeiramente em modelos animais e subseqüentemente em pacientes com osteogênese imperfeita.

Há aproximadamente quatro décadas descobriu-se a potencialidade das células hematopoiéticas diferenciarem-se em múltiplos tipos distintos, afirmou Vacanti *et al.*⁸⁵.

Para este estudo, optamos por utilizar células mononucleares da medula óssea por ser um método já utilizado na prática clínica, de baixo custo e por ser um método de fácil obtenção. A proposta deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico da fração mononuclear das células da medula óssea, bem como a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) e do fator de crescimento transformador (TGF- β), e o reparo ósseo.

Krebsbach *et al.*⁴⁵, afirma que o estroma da medula óssea consiste de uma população heterogênea de células que fornece

suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Esse estroma contém células com características de células tronco, as quais se diferenciam em osso, cartilagem, adipócitos, além de constituírem um suporte hematopoiético para os tecidos.

Os animais utilizados na pesquisa, ratos Wistar-Kyoto, eram geneticamente iguais, evitando qualquer risco de rejeição das células utilizadas.

Na última década os fatores de crescimento ganharam destaque, sendo PRP e TGF- β formas para a prática clínica.

Na maioria dos estudos clínicos é usado PRP, sendo aplicação local a via preferida.

Estudos anteriores utilizando PRP foram contraditórios sobre o efeito da cicatrização do defeito crítico^{86,87}. Uma das razões para estas contradições pode ser no método de purificação que é crucial para o sucesso experimental.

Santana *et al.*⁸⁸, em um estudo radiográfico em calvária de coelhos utilizando PRP, percebeu que o mesmo promoveu aumento da densidade óssea nas adjacências das cavidades cirúrgicas.

Observamos em nosso estudo que os tratamentos propostos tiveram diferentes resultados. Os grupo 1 e 2, CMs + TGF- β /CMs + PRP mostraram um fechamento positivo da lesão, mas não houve indicação de que um tratamento seja melhor que o outro. Conforme Xu, S.W⁸⁹, relata que o PRP juntamente com TGF- β aumenta a cicatrização em 2 semanas na formação óssea. Após 6 semanas atinge-se um platô diminuindo a nova formação óssea. Dessa forma, sugere-se uma redução no tempo de observação para melhor constatação dessa característica.

No grupo 3, CMs + PRP + TGF- β , houve um fechamento melhor no grupo controle, ou seja, foi verificado um retardo, uma taxa de redução da lesão no grupo tratado. Segundo Sakou, T⁹⁰ observou, há níveis TGF- β significativos no controle e nos tratados com PRP. O TGF- β foi aumentado nos ossos tratados e em 4 semanas teve um aumento significativo de TGF- β

no grupo controle. Os autores sugerem que em 4 semanas os ossos tratados com PRP ativaram o TGF- β estocado comparado com ossos controle para aceleração osteogênica.

Lynch *et al*⁹¹, relataram um aumento da densidade óssea ao redor de implantes associados com fatores de crescimento contidos nas plaquetas, sendo a quimiotaxia de células de reparo ósseo, entre elas os osteoblastos, uma função importante desempenhada pelos fatores de crescimento contidos nas plaquetas⁹². Isto pode explicar a maior densidade óssea encontrada nas áreas adjacentes às cavidades cirúrgicas.

Outro evento que pode explicar este acontecimento é que quando o PRP se contrai, há um sobrenadante rico em fatores de crescimento⁹³. Este sobrenadante pode ter escoado em torno do defeito crítico tratado com PRP inibindo o reparo ósseo no osso tratado. Isto explicaria porque o controle do grupo 3 teve uma resposta de fechamento positiva em relação ao tratado após 6 e 10 semanas, quando analisado radiograficamente.

Torna-se premente, portanto, estabelecer condições para que o tecido ósseo possa se regenerar em situações clínicas consideradas inóspitas, como em locais que apresentam suprimento sangüíneo comprometido, em áreas de difícil consolidação, em regiões que possuem defeitos com dimensões críticas ou onde o tecido esteja completamente ausente⁹⁴.

Foram feitas análise histológicas para comparar com as análises radiográficas.

Com relação à histologia, alguns aspectos podem ser apontados como explicação para o não encontro das células administradas nos animais do estudo, são eles: não adesão das células no local da lesão, resposta imunológica, volume de amostra de tecido analisado e sensibilidade da técnica.

Estudos realizados por Kunlin *et al*.⁹⁵ demonstraram que todas as vias de administração das células tronco resultaram em migração para o sítio de lesão.

Alguns estudos sugerem que o uso de imunossupressores seja um fator determinante para a sobrevivência em longo prazo das células tronco administradas. Existem fatores que contribuem para a intensidade da rejeição, o que inclui no tipo de célula a ser transplantada, a disparidade imunológica entre o doador e o receptor e quando e onde as células foram administradas⁹⁶. Em contrapartida, mesmo na ausência de imunossupressão, células transplantadas podem migrar e sobreviver nos locais de lesão⁹⁷.

A técnica de PCR reproduz uma amplificação exponencial de uma seqüência alvo específica. Caso tenham aderido, a quantidade de células transplantadas no tecido do receptor, e conseqüentemente a quantidade de DNA, mesmo amplificada, pode ser ínfima para a reação e portanto, não visualizável em gel de agarose 2%. Algumas técnicas mais sensíveis poderiam ser empregadas como *nested-PCR*, onde uma nova reação de PCR é aplicada ao produto de PCR já amplificado, utilizando *primers* que flanqueiam regiões mais internas no gene alvo, ou PCR em tempo real, onde uma molécula repórter é clivada a cada seqüência alvo amplificada, sendo a fluorescência emitida lida em tempo real. Em diagnósticos de infecções virais, onde a quantidade de material na maioria das vezes é muito diminuta e é importante que se quantifique a carga viral como monitoramento biológico, a técnica de PCR em tempo real é empregada com sucesso^{98, 99}.

A medula óssea apresenta células tronco hematopoiéticas¹⁰¹, que *in vitro* podem ser facilmente separadas das CTM. Porém, Payushima OV *et al.* 2006, afirmou em seu estudo que estas células não apresentaram capacidade de adesão pois são facilmente separadas durante as trocas de meio de cultura¹⁰².

Para avaliar a formação de colágeno e evidenciar a neoformação óssea, foram confeccionadas lâminas histológicas, e as imagens foram analisadas em um software específico Image-Pro Plus 6.1®. Com este programa, selecionamos a área de interesse e o próprio programa fez a contagem automática da área por número de pixel (figuras de 16b a 24b). A área tratada é comparada com a área não tratada (que é definida como

controle de 100% de neoformação óssea), adjacente à área tratada, com comprimento e larguras similares à da área tratada analisada da mesma lâmina histológica.

Burkitt *et al.*, afirmaram que a neoformação óssea ocorre tanto intramembranosa como endocondral. No local da fratura óssea, forma-se um coágulo sangüíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno. Este tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Células diferenciadas em condroblastos substituem o tecido granuloso fibroso com cartilagem hialina, formando um calo provisório que é flexível. Este calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa.

Desta forma, os resultados das análises histológicas, indicam que houve formação de colágeno evidenciando a neoformação óssea, tanto para o grupo tratado como para o controle. Porém, não indicam que esta formação possa ter sido influenciada pelos tratamentos propostos, haja visto não ter apresentado resultados significativos entre as propostas de tratamento.

6.1 LIMITAÇÕES DO MODELO EXPERIMENTAL SUGERIDO

No decorrer deste trabalho observou-se que seria possível controlar alguns fatores adicionalmente e possivelmente aumentar a significância e confiabilidade nos dados a fim de estabelecer significância estatística e rastreabilidade ao processo.

1. CONTROLE DAS DIMENSÕES DA LESÃO GERADA: inicialmente, dada a possibilidade de geração de lesões de tamanho e profundidade diferentes por geração de lesão a mão livre no processo utilizado sugeriu-se um controle maior da profundidade e do tamanho da lesão idealizando-se um equipamento capaz de controlar a geração da lesão. Também se sugere a geração de uma imagem por raios X logo após a geração da lesão. Esta imagem seria utilizada como base de referência para os estudos de redução da lesão em função do tempo.

2. DIMINUIR A INTERFERÊNCIA ENTRE TRATAMENTO E CONTROLE: para tanto se busca gerar um grupo controle e os demais tratados, aplicando um tipo de tratamento por rato e a lesão crítica nas duas patas traseiras dos animais, com o mesmo tratamento para o mesmo animal.

3. EVITAR O EXTRAVASAMENTO DE TRATAMENTO: para garantir a relação dose e fechamento da lesão, mantendo a quantidade de tratamento em função do tempo e garantir a confiabilidade dos dados, sugerimos a determinação de uma quantidade fixa de tratamento e a inserção de uma Membrana de Colágeno Bovino tipo I sobre a lesão crítica.

4. REDIMENSIONAMENTO DO GRUPO AMOSTRAL: definir o número de animais para o experimento de forma a considerar uma taxa de fraturas no fêmur e as variações estatísticas definidas neste trabalho.

5. DIMINUIR TEMPO DE ANÁLISE DA CIRURGIA: reduzir o tempo de análises radiográficas para garantir a confiabilidade dos tratamentos propostos. Da mesma forma, as análises histológicas devem ser feitas em dois tempos das análises e não somente em 10 semanas como feito. Neste período o osso pode ter se regenerado.

6. METODOLOGIA IMAGE PRO-PLUS: utilizamos o software Image Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics, Inc) que gerou registro automático das imagens da histologia. Portanto, não tem como registrar a metodologia destas imagens.

Como sugestão para aprimorar o trabalho poderia fazer uma análise da técnica de textura, já utilizada em estudos, na qual seria uma opção para restauração da área através da granulação, o que nos daria a profundidade da área.

CONCLUSÕES

- a) As células mononucleares da medula óssea não aderiram ao defeito crítico criado no fêmur do rato;
 - b) Não foi possível avaliar a eficiência relativa dos tratamentos propostos no reparo ósseo, uma vez que não houve diferenças significativas na avaliação dos grupos.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. Clin Orthop Relat Res. 1991;263:30-48.
 2. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, George, KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85:638-46.
 3. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999;14:529-35.
 4. Lenharo A. Plasma rico em plaquetas. Rev Catarinen Implantodonto. 2001;1:6-8.
 5. Meinel, L., O. Betz, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. Bone. 2006;39:922-31.
 6. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol. 2000;18:959-63.
 7. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell. 2003; 114:763-76.
 8. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. N Engl J Med. 2002;346:5-15.
-

9. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebeilatto C, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto agudo do miocárdio. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2003;20:270-8.
 10. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-209.
 11. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res.*2003;34:600-6.
 12. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005;57:874-82.
 13. Junqueira L.C. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica.* 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1999;111-28.
 14. Burkitt PR, Young B, Heath J.W. Tecidos esqueléticos. *Wheater Histologia Funcional.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1994;173-86.
 15. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999; 45:1353-8.
 16. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci.* 2000;98:217-40.
 17. Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res.* 1999;297:249-59.
 18. Hollinger JO, Buck DC, Bruder, SP. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: Linch SE, Genco RJ, Marx, RE. *Tissue Engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Chicago: Quintessence. 1999;17-53.
-

19. Okubo Y et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000;29:62-6.
 20. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21:667-81.
 21. Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med.* 2002;4:1-11.
 22. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8:147-59.
 23. Kierszbaum AL. *Histologia e Biologia Celular; Uma introdução à patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
 24. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235:176-90.
 25. Shenfield F, Pennings G, Sureau C, Cohen J, Devroey P, Tarlatzis B. I. The moral status of the pre-implantation embryo. *Hum Reprod.* 2001;16:1046-8.
 26. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature.* 2001; 414:129-31.
 27. Shenfield F, Pennings G, Sureau C, Cohen J, Tarlatzis B. II. The cryopreservation of human embryos. *Hum Reprod.* 2001;16:1049-50.
 28. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116:639-48.
 29. Zago MA, Covas DT. *Células tronco, a nova fronteira da medicina.* São Paulo:Atheneu; 2006
 30. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006;169:338-46.
-

31. Stem Cell Information. The National Institute of Health resource for stem cell research. [citado 2009 jul 20]. Disponível em www.stemcells.nih.com.
 32. Korbiling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept. *N Engl J Med*. 2003;349:570-82.
 33. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.
 34. Araújo JD, Araújo Filho JD, Ciorlin E et al. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. *J. Vasc. Bras*. 2005;4:357-65.
 35. Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater*. 2006;1:63-71.
 36. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002;35:657-69.
 37. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287:1433-8.
 38. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.
 39. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;215-30.
 40. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schawartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418:19.
 41. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:487-500.
-

-
42. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001;226:507-20.
 43. Payushima OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol*. 2006;33:2-18.
 44. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1991;200.
 45. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;165-81.
 46. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem*. 1999;74:616-27.
 47. Nagai N, Qin CL, Nagatsuka H, Inoue M, Ishiwari Y. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999;143-50.
 48. Sodek J, Cheifetz S. Molecular regulation of osteogenesis. In: Davis, J.E. *Bone Engineering*. Toronto: Rainbow Graphic and Printing Ltd. 2000;32-43.
 49. Kim K, Itoh T, Kotake SK. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*, New York, N.Y.1997;279-85.
 50. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4. ed. Porto Alegre. Artes Médicas,2002.
 51. Gowdak LHW, César LAM. Insuficiência coronariana na hipertensão arterial. *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*.2004;7:11-13.
 52. Lodish H et al. *Biologia Celular e Molecular*. 5 Ed. Artmed: Porto Alegre,2005.
-

-
53. Tognoli GK, Olsson DC, Martins DB et al. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*. 2007;6:10.
 54. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:881-7.
 55. Friedenstein AJ. et al. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16:381-90.
 56. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994;21:429-35.
 57. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-7.
 58. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 1995; 77:940-56.
 59. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988; 242:1528-34.
 60. Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl*. 1990;13:149-56.
 61. Zhou H, Hammonds RG, Jr., Findlay DM, Martin TJ, Ng KW. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol*. 1993; 155:112-9.
 62. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87:9843-7.
 63. Honda Y, Knutsen R, Strong DD, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S. Osteogenic protein-1 stimulates mRNA levels of BMP-6 and
-

decreases mRNA levels of BMP-2 and -4 in human osteosarcoma cells. *Calcif Tissue Int.* 1997;60:297-301.

64. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998;22:410-6.
 65. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol .* 2006;41:48-72.
 66. Castor CW, Ritchie JC, Williams CH, Jr., Scott ME, Whitney SL, Myers SL, et al. Connective tissue activation. XIV. Composition and actions of a human platelet autacoid mediator. *Arthritis Rheum.* 1979;22:260-72.
 67. Marx K, Garg AK. Dental and craniofacial applications of platelets rich plasma. Illinois, Quintessence Books. 2005;154.
 68. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000;113 :1161-6.
 69. Giannobile WV. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. *Tissue Engineering*, 1^a ed. Illinois, Quintessence Books,1999; 231-43.
 70. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller E.G. Investigation of Platelet-Rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* Chicago. 2002;60:1176-81.
 71. Dinato JC, Polido WD. *Implantes Osseointegrados: cirurgia e prótese.* São Paulo: Artes Médicas.2001;398.
 72. Eppley BA, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implication for wound healing. *Plats Reconstruct Surg.* 2004;114:1502-8.
 73. Gandhi A, Dumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone.* 2006;38:540-6.
-

-
74. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003;85:283-9.
 75. Plakachova et al. The bone regenerative effect of PRP in combination with on osteoconductive material in rat cranial defects. *Clinical Oral Implants Research.* 2006. 17:305-11.
 76. Rossi R et al. Utilização de plasma rico em plaquetas – proposta de um protocolo simplificado. Disponível em www.dentalnet.com.br , acesso em agosto de 2009.
 77. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.
 78. Kohn DF, Benson GJ et al. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Academic Press: New York,. 1997;Chapter 15.
 79. Hau Jann et al. Handbook of Laboratory Animal Science. 2005; v. 3. Editora CRC Press.
 80. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145:1301-8.
 81. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology.* 1992;24:17-27.
 82. Gibbs LS, Shaffer JB. Nucleotide sequence of bovine copper/zinc superoxide dismutase cDNA generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7171.
 83. Junior JW. Análise histopatológica comparativa das cápsulas de implantes de espumas de silicone e poliuretano em ratos. *Rev. Soc.Bras. Cir. Plást..* 2007;22:19-23.
-

-
84. Barroco RS. et al. Pé plano adquirido do adulto por disfunção do tendão do tibial posterior: avaliação clínica, imagenológica e morfométrica. Rev Bras Ortop. Vol. 33, Nº 7 – Julho, 1998.
 85. Vacanti, JP et al. Beyond transplantation. Arch. Surg.1998; 123:545-49.
 86. Weibrich G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. Bone. 2004;34:665-71.
 87. Sarkar MR. *et al.* Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen and platelet-rich plasma (PRP) an immunohistochemical analysis. Biomaterials. 2006;27:1817-823.
 88. Santana IS. Processo de Reparo de Cavidade Óssea Cirúrgica Preenchida ou não com Plasma Rico em Plaquetas: Estudo Radiográfico em Calvária de Coelho. Rev Bras Implantodon Prótese sobre Implante.2006;13:51-60.
 89. Xu SW. et al. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. Chin J Traumatol. 2003;6:160-66.
 90. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone. 1998;22:591-603.
 91. Lynch SE. et al. The effects of short-term application of a combination of plaquelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontal. 1991;62:458-67.
 92. Garg AK et al. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. Dental implantol Update 2000;11: 41-7.
 93. Landesberg R *et al.* Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet- rich plasma gel preparation. J Oral Maxilofac Surg. 2000;297-300.
 94. Boyan, B D *et al.* Bone and cartilage tissue engineering. Clin Plast Surg.1999;26:4:629-41.
-

-
95. Kunlin, J.; S. Vunjuan; X. Lin; O. M. Xiao; J. Childs; A. peel; A. logvinova; S. Banwait & D. A. Greenberg. Comparison of ischemiadiirected migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiology of disease*. 2005;18:366-74.
 96. Larsson, L. C.; H. Frielingsdorf; B. Mirza; S. Hansson; P. Anderson; K. A. Czech; M. Strandberg & H. Widner. Porcine Neural Xenografts in Rats and Mice: Donor Tissue Development and Characteristics of Rejection. *Experimental Neurology*. 2000;172:100-14.
 97. Irons H; J.G. Lind; C. G. Wakade; G. Yu; M. Hadman; J. Carroll; D. C. Hess & C. V Borlongan. Intracerebral Xenotransplantation Of Gfp Mouse Bone Marrow Stromal Cells In Intact And Stroke Rat Brain: Graft Survival And Immunologic Response. *Cell Transplant*. 2004;13:283-94.
 98. Lopes, BPT.; P. R. Rezende; L. M. C. Maradei-Pereira & J. A. R. De Lemos. Carga Proviral Do Htlv-1 E Htlv-2: Um Método Simples Através Da Pcr Quantitativa Em Tempo Real. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*. 2007; 39:548-52.
 99. Cunha, DM. C.; A. M. T. C. Silva; M. P. et al. Detecção do Genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino celular da laringe: Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real. *Rbac*. 2007;39:255-57.
 100. Rose, FR *et al*. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*. San Diego.2002; 292:1-7.
 101. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-20.
 102. Payushima OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol*. 2006;33:2-18.
-

ANEXOS

ANEXO A
CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 076/09 - CEUA

Porto Alegre, 05 de agosto de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais aprovou a alteração do título de seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 08/00044, intitulado: **"Modelo experimental em ratos no reparo ósseo de fêmur utilizando células tronco mononucleares no plasma rico em plaquetas"** para **"Modelo experimental em ratos no reparo ósseo de fêmur utilizando células mononucleares no plasma rico em plaquetas"**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez
Coordenador-Adjunto do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jeferson Braga Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60 sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B CARTA DE ALTERAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 346/08-PG

Porto Alegre, 27 de agosto de 2008.


A Pós-Graduanda
Márcia Illana Kopschina
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de dissertação intitulada "Modelo experimental em ratos no reparo ósseo do fêmur utilizando células tronco mononucleares no plasma rico em plaquetas" foi **aprovada** pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,


Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Jefferson Luiz Braga da Silva

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

ANEXO C – ARTIGO EM PORTUGUÊS**MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS NO REPARO ÓSSEO DO FÊMUR
UTILIZANDO CÉLULAS MONONUCLEARES NO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS****RESUMO**

INTRODUÇÃO: As células mononucleares da medula óssea têm sido utilizadas em diversas patologias na tentativa de regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar a adesão de células mononucleares sobre um defeito crítico, com a adição do plasma rico em plaquetas (PRP) e/ou TGF- β 1 (Fator de crescimento transformador Beta 1) e, por fim, verificar o reparo ósseo dos sítios defeituosos dos fêmures dos ratos.

MÉTODOS: Foi criado um defeito crítico bilateral nos fêmures de 33 ratos Wistar-Kyoto. Células mononucleares da medula óssea, TGF- β e PRP foram adicionadas no lado tratado da lesão e soro fisiológico no lado contralateral. Avaliou-se a adesão de células mononucleares sobre o defeito crítico e o reparo ósseo.

RESULTADOS:

A presença e conseqüente adesão das células mononucleares administradas nos animais tratados não foi evidenciada através de técnica de PCR. As análises radiográficas evidenciam fechamento da lesão nos grupos CMs + TGF-B e CM + PRP, porém, não podemos afirmar se foi pelos tratamentos administrados ou pela própria regeneração óssea, quando analisadas em 6 e 10 semanas, haja visto não apresentarem diferenças significativas entre os grupos.

CONCLUSÃO:

- a) as células mononucleares da medula óssea não aderiram ao defeito crítico criado no fêmur do rato;
- b) Não foi possível avaliar a eficiência relativa dos tratamentos propostos no reparo ósseo, uma vez que não houve diferenças significativas na avaliação dos grupos.

Palavras-chaves: defeito crítico, fêmur, PRP, TGF- β 1, CMs

EXPERIMENTAL MODEL IN RATS IN THE FEMORAL BONE REPAIR IN MONONUCLEAR CELLS USING PLATELET-RICH PLASMA

ABSTRACT

BACKGROUND: Mononuclear cells from bone marrow have been used in various treatments of diseases in an attempt to regenerate tissues. The objective of this study was to evaluate the accession and proliferation of mononuclear cells in a critical defect, with the addition of platelet-rich plasma (PRP) and / or TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), and then to evaluate bone repair at defective sites on the femurs of rats.

METHODS: We created a critical defect on the bilateral femurs of 33 Wistar-Kyoto rats. Mononuclear bone marrow cells, TGF- β and PRP were added to the lesion on the treated side and saline on the contralateral side. We determined the adhesion of mononuclear cells at the critical defect and bone repair.

RESULTS: The presence and consequent access of mononuclear cells administered in the treated animals was evidenced by the PCR technique. Radiographic analysis showed closure of the lesion groups in MCs + TGF- β and MCs + PRP, however, we can not say whether the treatment was administered or by the bone regeneration, when analyzed at 6 and 10 weeks, there is seen not differ substantially between groups.

CONCLUSIONS:

- a) Bone marrow mononuclear cells did not adhere at the critical defect created in the rat femur;
- b) It was not possible to assess the relative efficiency of the proposed treatments on bone healing, since no significant differences in the evaluation of groups.

KEYWORDS: femur, PRP, TGF- β 1, MCs, rats

**EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PLUS
PLATELET-RICH PLASMA IN FEMORAL BONE REPAIR MODEL IN
RATS**

Márcia I. Kopschina¹, Daniel R. Marinowic³, Caroline Peres Klein⁴, Camilla Araújo Assad⁴, Tiago Alexi Freitas⁴, Gabriela Hoff², Jefferson Braga Silva^{1,4}

1 Post-Graduate Medicine and Health Sciences, PUCRS

2 School of Physics, PUCRS

3 Institute for Biomedical Research, PUCRS

4 Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, PUCRS

¹ Márcia Illana Kopschina, Summary of Dissertation submitted to the Post-Graduate Medicine and Health Sciences, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, to obtain the title of Master of Medicine and Health Sciences. Area of concentration: Surgical Clinic. e-mail: kopi@uol.com.br

Correspondence to: May 24, 1333 apt 301, neighborhood Vila Rosa, Novo Hamburgo, RS, Brazil. ZIP 93315-120.

Daniel R. Marinowic, Biologist, MSc in Neuroscience, Center for Cellular Therapy, Laboratory of Neuroscience, Institute of Biomedical Research, PUCRS, Avenue Ipiranga, n / 6690, 2^o andar, ZIP 90610-000, Porto Alegre / RS, Brazil. e-mail: daniel.marinowic@pucrs.br

Caroline Peres Klein, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil, ZIP: 90619-001. e-mail: carolpkl@gmail.com

Camilla Araújo Assad, Medical Student PUCRS, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil ZIP: 90619-001. e-mail: camilla_assad@hotmail.com

Tiago Alexi Freitas, Medical Student PUCRS, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil ZIP: 90619-001. e-mail: talex@hotmail.com

Prof. Gabriela Hoff, PhD in Nuclear Biosciences - Medical Physics, Faculty of Physics, PUCRS, Avenue Ipiranga, 6681/P10-207, Porto Alegre, RS, Brazil. e-mail: ghoff@pucrs.br

Prof. Jefferson Braga da Silva, Lecturer in Surgery of the Hand, UNIFESP,, Adjunct Professor, School of Medicine, Catholic University of Rio Grande do Sul, Coordinator of the Medical and Surgical Research of the Skills Laboratory, PUCRS. Coordinator of Concentration in Surgery, Graduate Program in Health Sciences, PUCRS, Av Ipiranga 6690, conj. 216, Clinival Center, PUCRS, Botanical Garden, ZIP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil e-mail: jeffmao@terra.com.br

1 INTRODUÇÃO

A possibilidade de regeneração de tecidos e órgãos tem sido alvo de pesquisas ao longo dos anos. Desta maneira, novas áreas da Medicina investigam técnicas de regeneração tecidual a partir de marcadores naturais (fatores de crescimento) e componentes do próprio organismo (células tronco).¹

Assim, as duas vertentes de especial interesse, juntamente com pesquisadores, colaboram para o avanço das bases científicas aproximando a aplicação clínica ao objeto de investigação, formando novos parâmetros para a produção de tecidos *in vitro*, assim como para a elaboração de procedimentos que envolvam reparo e regeneração teciduais *in vivo*.²

O tecido ósseo passa constantemente por um processo morfológico dinâmico seguindo sua formação original. Desta forma, o metabolismo ósseo é mantido por um constante processo de reabsorção e neoformação em resposta às mudanças físicas e biomecânicas. Este evento é controlado por dois mecanismos: a regulação sistêmica e a local, que através de hormônios controlam os níveis de cálcio e de fosfato. Junto a isso ainda existem os fatores de crescimento que atuam sobre todas as células da estrutura óssea auxiliando no processo de reparo tecidual.^{3,4,5}

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autógeno e sua estratégia terapêutica baseia-se na aceleração da cicatrização por meio da concentração dos fatores de crescimento presentes no citoplasma plaquetário, que são os indicadores universais de quase todos os eventos cicatriciais⁶ e isento de características tóxicas ou imunorreativas.³

Estudos descritos na literatura têm mostrado que entre as células da camada mononuclear obtida de medula óssea, de cordão umbilical e em outros tecidos, existem tanto células tronco hematopoiéticas quanto células tronco mesenquimais.^{7,8} As células tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células do tecido sanguíneo, e possuem como proteína de membrana característica, o CD34. As células tronco mesenquimais dão origem às células que irão formar os outros tecidos do organismo, e

expressam em suas membranas os marcadores CD105 (endogлина) e CD117 (c-kit).^{9,10,11} Assim, é possível selecionar as populações celulares específicas mais adequadas para a regeneração do tecido de interesse.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Nós utilizamos para este estudo 39 ratos da espécie Wistar-kyoto, isogênicos, pesando entre 200 e 250g. Seis ratos, machos, foram utilizados como doadores da medula óssea e 33 ratas, fêmeas, utilizadas para o protocolo de intervenção. Os ratos foram adquiridos no biotério da PUCRS, dispostos em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libitum*. Foi respeitado o ciclo biológico claro/escuro de 12 horas.

2.2 Descrição dos fatores de crescimento utilizados no protocolo e seus processos de extração

a) TGF- β 1 – Fator de Crescimento Transformador Beta 1 utilizado no protocolo

O produto foi adquirido do Laboratório Biosource, com pureza de >98 %. e foi reconstituído com água destilada estéril até uma concentração de 50 μ g/mL. Foi utilizada uma concentração de 6ng/mL de TGF- β 1 em um volume adaptado de 30 μ L no defeito crítico criado.¹²

b) Extração PRP (Plasma Rico em Plaquetas) da artéria carótida de ratos machos, através de punção cardíaca

Para extração do PRP através de punção cardíaca, seguimos o protocolo de Plachokova *et al*¹³ e para obtenção do PRP seguimos o protocolo de Rossi *et al*.¹⁴

Foi utilizado 30 μ L de PRP sobre o defeito crítico.¹⁵ Realizamos hemograma nas amostras de PRP, para avaliar a quantidade de plaquetas

presentes na amostras dos 3 ratos machos utilizados para os procedimentos de tratamento. Os mesmos foram realizados no contador de células automatizado Coulter STKS, do Hospital São Lucas da PUC/RS, conforme instruções do fabricante. Em cada amostra da alíquota de 150uL de PRP, apresentou os seguintes resultados:

Animal grupo 1 – plaquetas no PRP = 1.650.000	(1.650 10 ³ / uL)
Animal grupo 2 – plaquetas no PRP = 2.247.000	(2.247 10 ³ / uL)
Animal grupo 3 – plaquetas no PRP = 2.280.000	(2.280 10 ³ /uL)

c) Extração de células mononucleares da medula óssea de ratos machos

A extração das CMs da medula óssea do rato doador (1 rato macho para cada grupo do estudo) foi realizada após o sacrifício com superdosagem de Tiopental intracardíaca (2ml, equivalente a 100mg/kg de peso do rato). A obtenção da fração mononuclear da medula óssea foi realizada através da lavagem dos fêmures, tíbias, úmeros e ulnas dos animais. Realizamos a retirada dos ossos e posterior lavagem com solução DPBS (Gibco®, EUA). As epífises ósseas foram seccionadas. A extração do estroma medular foi obtida pela introdução de uma agulha 32G nas extremidades ósseas e posterior lavado interno com DPBS heparinizado. O conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm e ressuspendido em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco®, EUA). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade de 1.191g/L (Sigma-Aldrich®, EUA) A 400g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain (azul tripan) 0,4% (Gibco®, USA), apresentando 99% de células viáveis. Para cada animal, foi utilizada alíquotas de 30µL contendo 10⁶ células no defeito crítico criado.

2.3 Protocolo de criação do defeito crítico

A indução anestésica no animal foi feita sob contenção e em decúbito dorsal. Os anestésicos foram aplicados por via intraperitoneal utilizando agulha e seringa de insulina. Administramos Cloridrato de Cetamina (80-100 mg/mL associado à Cloridrato de Clorpromazina (1,6mg – 2mg/ml por quilograma de peso do rato).¹⁶

Para a criação do defeito crítico no fêmur do rato de 5mm, seguimos o protocolo de Meinel, L. *et al.*¹⁷ Criamos um defeito crítico no fêmur bilateral. Os ratos utilizados para este estudo foram divididos em 3 grupos de 11 ratos cada, sendo os procedimentos controle e tratamento no mesmo rato. Os animais foram devidamente anestesiados, conforme descrito anteriormente. Após ter-se certificado o efeito da anestesia, foi executada a tricotomia das patas traseiras.

Para o tratamento, os animais foram posicionados em decúbito lateral e efetuamos uma incisão transversal, de aproximadamente 2cm, com lâmina de bisturi Aço Carbono 15 (Feather Safety Razor Co, LTD), coxa direita e esquerda. Para exposição do fêmur, o músculo bíceps femoral foi tracionado posteriormente enquanto o músculo glúteo máximo, tensor da fáscia lata e vasto lateral foram tracionados anteriormente. Utilizamos um afastador para expor o tecido ósseo.

Sucedeu-se o descolamento do periósteo com Descolador Freer 19cm (Neumar).

Uma broca Carbide haste longa n° 8 foi conectada a um motor Odontológico de Suspensão Mini Beltec™ com alta rotação (rotação máxima de acionamento 15.000 rpm) para perfurar o fêmur enquanto o tecido era irrigado manualmente com solução salina e drenado com bomba Vácuo Aspiradora Nevoni™.

O defeito crítico foi na cavidade da diáfise média, entre a linha áspera e o terceiro trocânter com aproximadamente 5mm de comprimento por 2,5mm de largura e com profundidade suficiente até chegar ao canal medular,¹⁷ para aplicação de células mononucleares e o mix de PRP/TGF-β

no fêmur direito e no fêmur esquerdo solução salina. Cada tratamento gerou um grupo de estudo:

- Grupo 1 – utilização de 30µL CMs com 30µL fator de crescimento transformador Beta (TGF-β);
- Grupo 2 – utilização de 30µL CMs com 30µL PRP (plasma rico em plaquetas).
- Grupo 3 – utilização de 30µL CMs com 30µL fator de crescimento transformador Beta (TGF-β) e 30µL PRP (plasma rico em plaquetas);

Seguiu-se a sutura simples com porta-agulha Mayo-Hegar com ponta de Videa e fio de mononylon Ethilon nº 5 da Ethicon™. A sutura foi realizada respeitando-se os planos das estruturas. Primeiramente foi reaproximado o perióstio, seguido da união das camadas musculares e, por fim, a do tecido cutâneo. No lado esquerdo foi realizado o mesmo procedimento de sutura.

No pós-operatório, nas primeiras 24 horas nós utilizados como analgesia Ketoprofen 5mg/kg de peso subcutânea.¹⁸ Após 48 horas utilizamos Paracetamol 200mg/ml como analgesia com dose de 1ml/20 ml de H₂O (água), equivalente a uma dose de 125 a 150mg de Paracetamol/dia.

2.4 Exames Radiográficos para acompanhamento do crescimento das lesões

Para a realização das imagens selecionamos o equipamento mamográfico Mamomat 3000 da marca Siemens, com aquisição tipo em tecnologia FUJI CR. Foram utilizados transdutores de imagens *Image Plate* (IP) da FUJI específicos para mamografia. A tecnologia aplicada à mamografia foi selecionada dada as características de tamanho dos ratos e contraste da imagem para posterior análise. Para o processamento das imagens foi utilizada uma leitora FCR Profect CS de marca FUJI, modelo CR-IR 363.

A técnica radiográfica utilizada consistiu em uma combinação alvo-filtro de Mo-Mo, tensão aceleradora de tubo de 28 kVp e carga transportada pelo tubo de 14 mAs (técnica mais adequada para imageamento da lesão fêmur destes animais). Para a realização da coleta de dados cada rato foi colocado na posição central da área de irradiação em posição decúbito ventral. Após a leitura dos IP, as imagens foram salvas em formato dicom, sendo identificado o grupo e o número do animal em cada coleta, bem como a semana de tratamento (se sexta ou se décima).

2.5 Eutanásia

A eutanásia foi realizada após 10 semanas de pós-operatório, seguindo o protocolo de Kohn, D F *et al.*¹⁶ para posterior realização das análises histológicas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Para Uso de Animais – CEUA/PUCRS.

2.6 Identificação do DNA de células mononucleares – Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com fenol/clorofórmio baseado na metodologia descrito por Isola *et al.*¹⁹

2.7 Análise Molecular – PCR

Para a identificação das células administradas nas lesões utilizamos a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Seguimos o protocolo de Kary Mullis²⁰ para realização desta técnica.

2.8 Histoquímica

2.8.1 Coloração Picrosirius

Para avaliação histológica utilizamos a técnica de picrosirius, que constitui em um método histoquímico específico para a percepção de

estruturas compostas de moléculas de colágeno orientadas.²¹ A coloração pelo método de picrossirius faz com que grande quantidade de moléculas do Sirius Red, de caráter ácido e alongadas, disponham-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que provoca aumento considerável da birrefringência das fibras que contêm colágeno quando observadas à luz polarizada.²²

2.8.2 Técnica de coloração

Os fêmures foram descalcificados com ácido fórmico 5% em DPBS (GIBCO™ U.S.A). O material desidratado foi embebido em parafina utilizando a estação LEICA TP 1020™ (LEICA, JAPAN). Os fêmures foram emblocados em parafina e realizou-se cortes de 5µm na altura da lesão utilizando micrometro OLYMPUS CUT 4060™ (OLYMPUS, JAPAN). O material foi colocado em estufa à 60°C por 24 horas, após, foram desparafinizadas (xilol 2X por 5 minutos, álcool absoluto – 4X por 2 minutos) e hidratadas em água corrente. Em seguida foi realizada a incubação em solução de picrossirius à 1% durante uma hora seguido de lavagem em água corrente por 20 minutos. As lâminas foram desidratadas e montadas com bálsamo de Canadá. As lâminas foram codificadas para posteriormente serem fotografadas e analisadas.

As imagens das seções histológicas foram capturadas por uma vídeo câmera instalada a um microscópio Olympus BX40 no Laboratório de Patologia do HSL/PURS e posteriormente analisadas com auxílio do software Image Pro-Plus 6.1, conforme figuras 1(a); 1(b); 2(a); 2(b), grupo tratado e grupo controle.

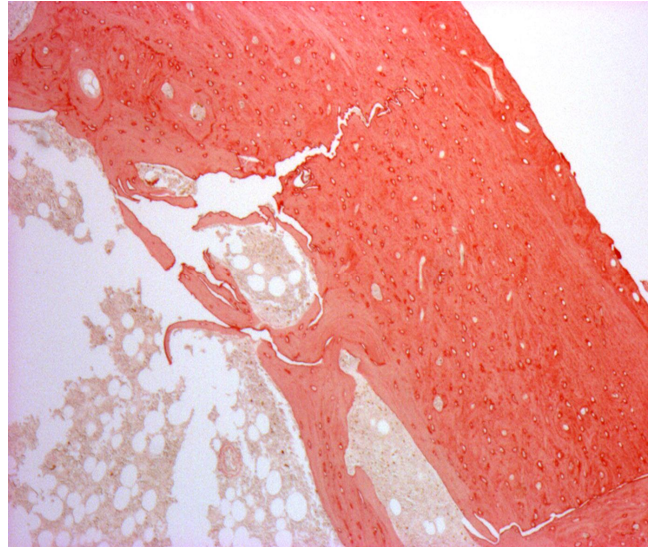


Figura 1(a). Fotografia de lâmina histológica corado com picrosirius, do fêmur de rato grupo tratado CMs + TGF- β . Aumento 50X.

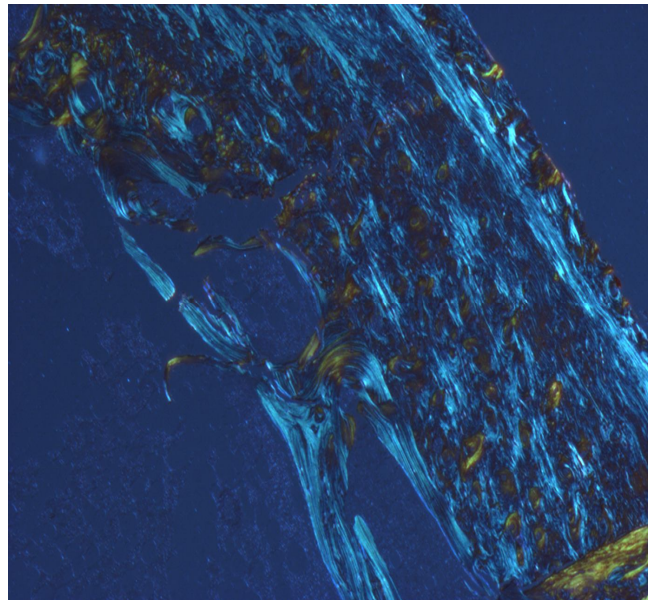


Figura 1(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo controle CMs + TGF- β . Aumento 50X.

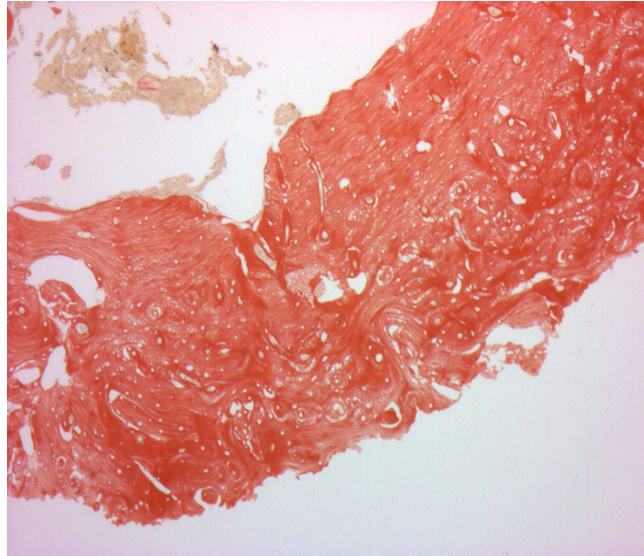


Figura 2(a). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP. Aumento 50X.

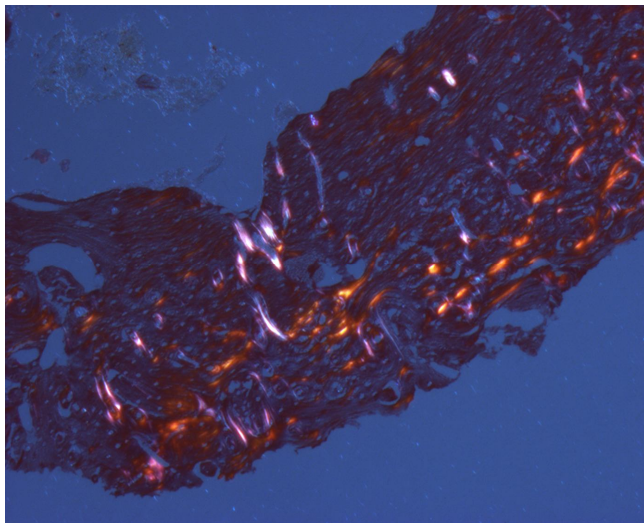


Figura 2(b). Fotografia de lâmina histológica corada com picrosirius polarizada, do fêmur de rato, grupo tratado CMs + PRP. Aumento 50X.

2.9 Análise Estatística

Os resultados das imagens do Rx foram submetidos à análise de variância ANOVA (uma via). A comparação do tempos foi realizada pelo teste t de student. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ como diferença estatística e poder estatístico de 95%. Os dados foram analisados no programa SPSS 14.0. Os dados obtidos tanto para análises de Rx e histologia foram digitados em uma planilha eletrônica (Microsoft Office Excel 2003).

3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO RADIOLÓGICA – RESULTADOS DOS GRÁFICOS

A avaliação radiológica realizada no período pós-operatório entre 6 e 10 semanas mostrou diferentes resultados entre os três grupos de tratamento.

Como pode se observar nos gráficos da figura 1 e 2, tanto para o comprimento quanto para a área houve a constatação de fechamento da lesão tanto para o grupo controle quanto para o tratado em todos os tratamentos.

Observou-se na maior parte dos dados o valor médio \pm DP calculado não engloba todo o conjunto de dados avaliados, o que demonstra uma grande flutuação dos dados para a metodologia proposta.

Na figura 1, observou-se que para os grupos CMs + TGF- β /CMs + PRP não foi encontrada nenhuma diferença estatística. Existe uma indicação para estes grupos de que o tratamento é uma opção melhor do que o controle.

Entretanto o grupo CMs + PRP + TGF- β apresentou um comportamento anômalo onde o grupo tratado apresentou pior desempenho do que o controle. Desta forma existe forte indicação de que este tratamento não seja indicado para estimulação do reparo ósseo.

O mesmo comportamento foi verificado para análise apresentada no gráfico 2, considerando o comprimento da lesão, que o desempenho não esperado do grupo CMs + PRP + TGF- β pode ser explicado com base no relato de Santana, I.S., 2006.²³

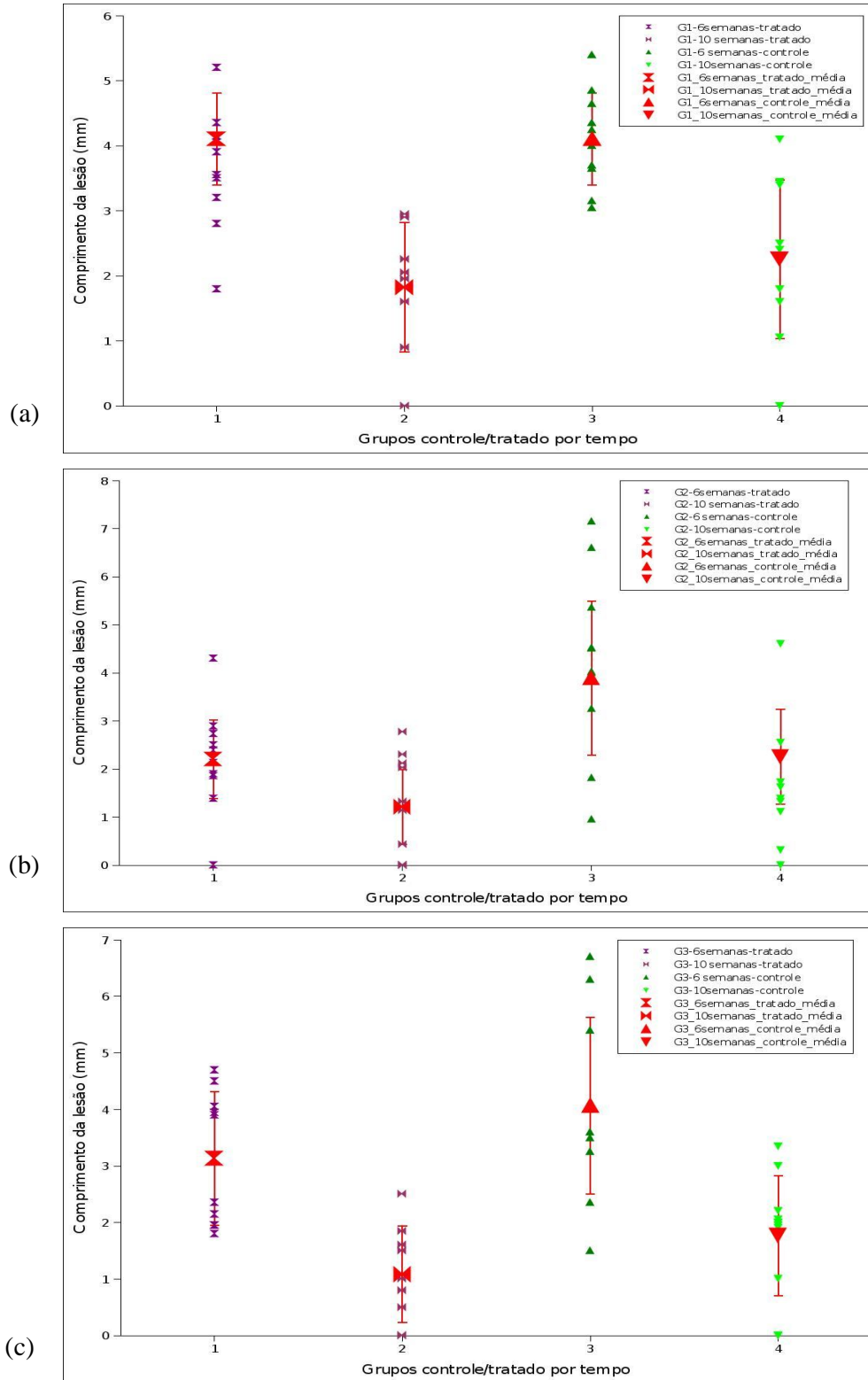


Figura 4. Gráficos da evolução do comprimento da lesão para 6 e 10 semanas dos grupos controle e tratado e seus respectivos valores médios e desvios padrões para (a) grupo CMs+TGFβ, (b) CMs+PRP e (c) CMs + PRP + TGFβ.

As figuras 3 e 4 mostraram que a taxa de redução da área e do comprimento da lesão intercomparando os grupos em função do tempo.

Nestas figuras observou-se a taxa de redução significativamente negativa para o grupo CMs + PRP + TGF- β , o que evidencia o comportamento de fechamento melhor para o grupo controle. Este grupo apresentou a taxa média de -18,6 % pp (pontos percentuais). Para os demais grupos CMs + TGF- β e CMs + PRP o valor médio da taxa de redução ficou 17,2% pp e 12,7% pp respectivamente.

O grupo 2 , CMs + PRP, apresentou melhor desempenho na taxa de redução, sendo 66% mais acentuado no tratamento do que no controle. O grupo 1, CMs + TGF- β apresentou uma taxa de redução de 62% melhor no tratado do que no controle.

O grupo 3 , CMs + PRP + TGF- β apresentou uma taxa de redução de 66% melhor no controle do que no tratamento, o que sinaliza que efetivamente inibe o reparo ósseo.

Mesmo comportamento é observado quanto ao comprimento da lesão onde grupo 1 e 2 apresentaram em média 9,8% e 12,3% respectivamente de redução desta dimensão. Já o grupo 3 mostrou -10,6% de reparo ósseo na lesão, quando são intercomparados controle com tratado.

Além disso, a média de taxa de redução para os três grupos foi de aproximadamente 0,923% o que não existe significância estatística entre o grupo controle e tratado.

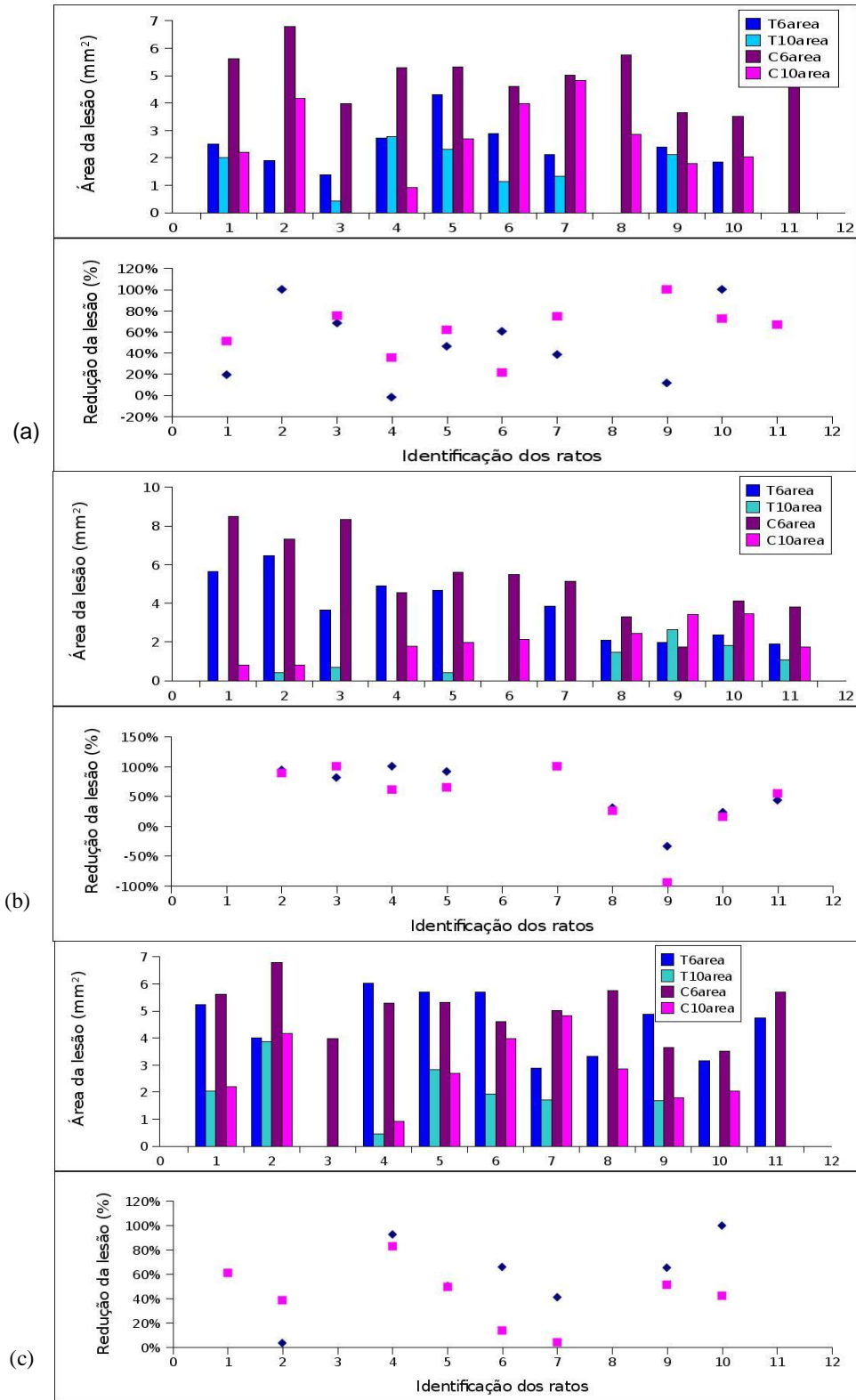


Figura 5. Gráficos da taxa de redução da área na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF-β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF-β. A cor rosa indica grupo Controle e a cor azul indica grupo Tratado.

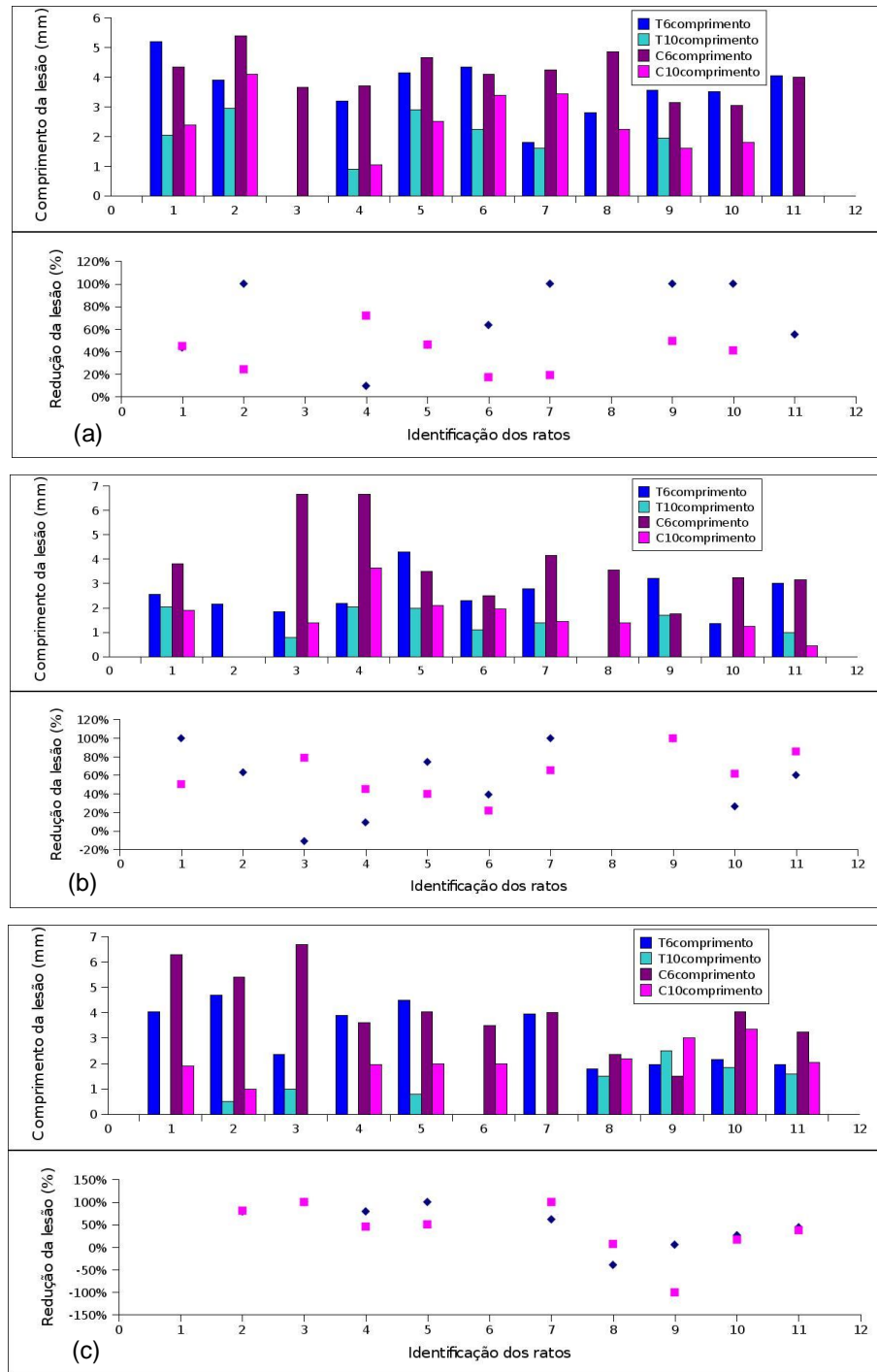


Figura 6. Gráficos da taxa de redução de comprimento na lesão do fêmur em 6 e 10 semanas nos grupos (a) CMs + TGF-β (b) CMs + PRP (c) CMs + PRP + TGF-β. A cor rosa indica grupo Controle e a cor azul indica grupo Tratado.

Na figura 4 (a), grupo 1, CMs + TGF- β observou-se que dos 9 animais do estudo, 6 apresentaram um fechamento do defeito crítico maior no fêmur tratado do que no fêmur controle. Neste grupo tivemos dois animais com fraturas de fêmur, nos quais foi excluído do estudo.

Na figura 4 (b), grupo 2, CMs + PRP observou-se que dos 10 animais do estudo, 5 apresentaram um fechamento do defeito crítico maior no grupo controle. Neste grupo tivemos 1 animal com fratura de fêmur, no qual foi excluído do estudo.

Na figura 4 (c), grupo 3, CMs + PRP + TGF- β observou-se que dos 9 animais do estudo, 2 animais apresentaram um fechamento maior no grupo controle, sendo que 4 animais apresentaram o mesmo resultado no fechamento do defeito crítico. Este grupo apresentou o pior resultado comparando par a par. Neste grupo tivemos 2 animais com fratura de fêmur, no qual foi excluído do estudo.

De forma geral, este gráfico mostra fêmur controle e tratado em função do tempo e a taxa de redução do grupo controle e tratado.

3.2 ADESÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

A presença e conseqüente adesão das células mononucleares administradas nos animais tratados não foi evidenciada através de técnica de PCR utilizando *primers* complementares a seqüencia do gene TSPY como marcador.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA PELA TÉCNICA DE PICROSIRIUS

Os resultados da avaliação foi feita em um grupo amostral de animais por grupo após 10 semanas pós-operatório. A avaliação destas lâminas histológicas evidenciou neoformação óssea, com a presença de colágeno tanto para grupo controle, como no tratamento.

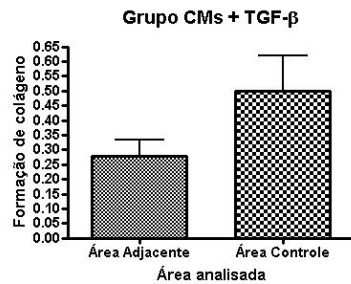
Com o auxílio do programa Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Inc.), foi selecionada a área correspondente ao osso de cada imagem. Tendo sido a área óssea da imagem – tecido ósseo normal estipulada como

100% de neoformação (ideal) a ser buscada, foi calculada a porcentagem da neoformação de osso da área tratada em comparação com os mesmos. Com o n utilizado neste estudo, os grupos testados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de neoformação promovida por estes tratamentos utilizados em relação ao controle, conforme figura 7 (a);(b);(c);(d);(e);(f).

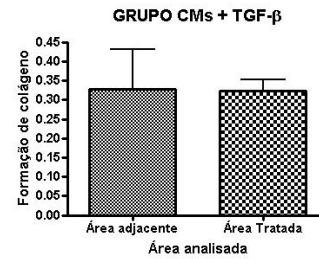
Observa-se que o gráfico da figura 7 (a) representa o grupo CMs + TGF- β relacionando a área adjacente ao controle. O mesmo apresentou uma formação de colágeno maior na área controle, com $p=0,172$. Já no gráfico 7 (b) do mesmo grupo, apresentou uma formação de colágeno muito próxima entre a área adjacente e a área tratada, sendo $p=0,967$, não sendo significativo o percentual entre as áreas. Analisando a área tratada em relação ao controle, conforme mostra o gráfico 7 (c), observamos que a formação de colágeno no tratado foi menor em relação ao controle com $p=0,228$.

A mesma análise foi feita no grupo CMs + PRP. Como mostra o gráfico 7 (d), relacionando área adjacente e área controle, o mesmo mostrou que a formação de colágeno foi menor em relação a área adjacente com $p=0,398$. Já no gráfico 7 (e) do mesmo grupo, relacionando área adjacente e área tratada, a formação de colágeno foi maior na área tratada com $p=0,378$. No gráfico 7 (f) mostra a relação entre a área tratada e área controle, sendo que a área controle teve uma formação maior de colágeno com $p=0,296$.

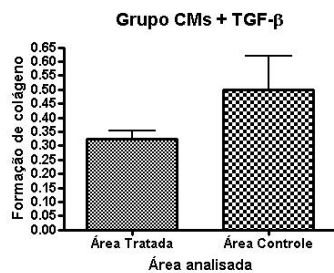
Os resultados das análises histológicas indicam que tanto para o grupo tratado como para o grupo controle houve formação de colágeno evidenciado neoformação óssea. Porém não houve diferença entre os tratamentos propostos.



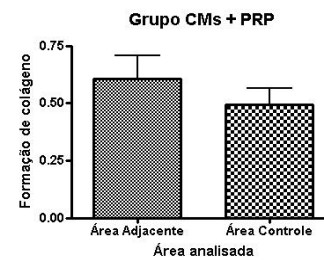
(a)



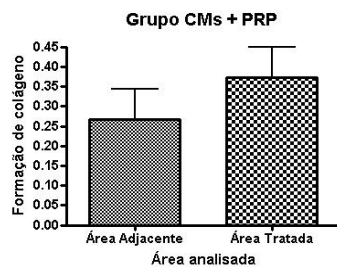
(b)



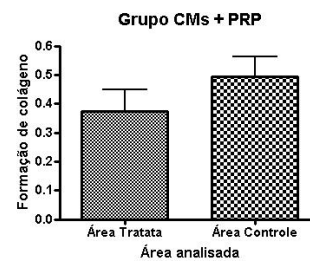
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 7: Gráficos de avaliação neoformação óssea com técnica picosirius

(a) Grupo CMs + TGF-β - Área adjacente X Área Controle $p=0,172$

(b) Grupo CMs + TGF-β - Área adjacente X Área Tratada $p=0,967$

(c) Grupo CMs + TGF-β - Área Tratada X Área Controle $p= 0,228$

(d) Grupo CMs + PRP - Área adjacente X Área Controle $p= 0,398$

(e) Grupo CMs + PRP - Área adjacente X Área Tratada $p=0,378$

(f) Grupo CMs + PRP - Área Tratada X Área Controle $p=0,296$

4 DISCUSSÃO

A fratura proximal de fêmur contribui consideravelmente para a morbidade e mortalidade principalmente em idosos devido a doenças pré-existentes e a complicações resultantes ao confinamento. Estudos recentes com células tronco têm demonstrado grande capacidade de regeneração tecidual óssea, primeiramente em modelos animais e subseqüentemente em pacientes com osteogênese imperfeita.

Haja visto, o foco deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico da fração mononuclear das células da medula óssea, bem como a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) e fator de crescimento transformador (TGF- β) e o reparo ósseo.

Há aproximadamente quatro décadas descobriu-se a potencialidade de as células hematopoiéticas diferenciarem-se em múltiplos tipos distintos, afirmou Vacanti *et al.*,²⁴ 1998.

Para este estudo, optamos por utilizar células mononucleares da medula óssea por ser um método já utilizado na prática clínica, de baixo custo e por ser um método de fácil obtenção.

Krebsbach *et al.*,²⁵ afirma que o estroma da medula óssea consiste de uma população heterogênia de células que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Esse estroma contém células com características de células tronco, as quais se diferenciam em osso, cartilagem, adipócitos, além de constituírem um suporte hematopoiético para os tecidos.

Os animais utilizados na pesquisa, ratos Wistar-Kyoto, eram geneticamente iguais, evitando qualquer risco de rejeição das células utilizadas.

Na última década os fatores de crescimento ganharam destaque, sendo PRP e TGF- β formas para a prática clínica.

Na maioria dos estudos clínicos é usado PRP, sendo aplicação local a via preferida.

Estudos anteriores utilizando PRP foram contraditórios sobre o efeito da cicatrização do defeito crítico.²⁶⁻²⁷ Uma das razões para estas

contradições pode ser no método de purificação que são cruciais para o sucesso experimental.

Santana *et al.*²⁵ em um estudo radiográfico em calvária de coelhos utilizando PRP, percebeu que o mesmo promoveu aumento da densidade óssea nas adjacências das cavidades cirúrgicas.

Observamos em nosso estudo que os tratamentos propostos houveram diferentes resultados. Os grupos 1 e 2, CMs + TGF- β /CMs + PRP mostraram um fechamento positivo da lesão, mas não houve indicação de que um tratamento seja melhor que o outro. Conforme Xu, S.W,²⁸ relata que o PRP juntamente com TGF- β aumenta a cicatrização em 2 semanas na formação óssea. Após 6 semanas atinge um platô diminuindo a nova formação óssea.

No grupo 3 , CMs + PRP + TGF- β , houve um fechamento melhor no grupo controle, ou seja, houve uma taxa de redução da lesão melhor no grupo controle. Segundo Sakou,²⁹ T., em seu estudo com fêmures de ratos, observou níveis TGF- β significativos no controle e nos tratados com PRP. O TGF- β foi aumentado nos ossos tratados e em 4 semanas teve um aumento significativo de TGF- β no grupo controle. Os autores sugerem que em 4 semanas os ossos tratados com PRP ativaram o TGF- β estocado comparado com ossos controle para aceleração osteogênica.

Lynch *et al.*,³⁰ relataram um aumento da densidade óssea ao redor de implantes associados com fatores de crescimento contidos nas plaquetas, sendo a quimiotaxia de células de reparo ósseo, entre elas os osteoblastos, uma função importante desempenhada pelos fatores de crescimento contidos nas plaquetas, Garg AK.³¹ Isto pode explicar a maior densidade óssea encontrada nas áreas adjacentes às cavidades cirúrgicas.

Outro evento que pode explicar este acontecimento é que quando o PRP se contrai, há um sobrenadante rico em fatores de crescimento³². Este sobrenadante pode ter escoado em torno do defeito crítico tratado com PRP inibindo o reparo ósseo no tratado. Isto explicaria porque o controle teve uma resposta de fechamento positiva em relação ao tratado após 6 e 10 semanas, quando analisado radiograficamente.

Torna-se premente, portanto, estabelecer condições para que o tecido ósseo possa se regenerar em situações clínicas consideradas inóspitas, como em locais que apresentam suprimento sangüíneo comprometido, em áreas de difícil consolidação, em regiões que possuem defeitos com dimensões críticas ou onde o tecido esteja completamente ausente Boyan *et al.*³³

Foram feitas análise histológicas para comparar com as análises radiográficas.

Com relação à histologia, alguns aspectos podem ser apontados como explicação para o não encontro das células administradas nos animais do estudo, são eles: não adesão das células no local da lesão, resposta imunológica, volume de amostra de tecido analisado e sensibilidade da técnica.

Estudos realizados por Kunlin *et al.*³⁴ demonstraram que todas as vias de administração das células tronco resultaram em migração para o sítio de lesão.

Alguns estudos sugerem que o uso de imunossupressores seja um fator determinante para a sobrevivência em longo prazo das células tronco administradas. Existem fatores que contribuem para a intensidade da rejeição, isso está incluído o tipo de célula a ser transplantada, a disparidade imunológica entre o doador e o receptor e quando e onde as células foram administradas.³⁵ Em contrapartida, mesmo na ausência de imunossupressão, células transplantadas podem migrar e sobreviver nos locais de lesão, Irons *et al.*³⁶

A medula óssea apresenta células tronco hematopoiéticas,³⁷ que *in vitro* podem ser facilmente separadas das CTM. Porém, Payushima OV *et al.* 2006, afirmou em seu estudo que estas células não apresentaram capacidade de adesão pois são facilmente separadas durante as trocas de meio de cultura.³⁸

A técnica de PCR reproduz uma amplificação exponencial de uma seqüência alvo específica. Caso tenham aderido, a quantidade de células transplantadas no tecido do receptor, e conseqüentemente a quantidade de DNA, mesmo amplificada, pode ser ínfima para a reação, e, portanto, não

visualizável em gel de agarose 2%. Algumas técnicas mais sensíveis poderiam ser empregadas como neste-PCR, onde uma nova reação de PCR é aplicada ao produto de PCR já amplificado, utilizando primers que flanqueiam regiões mais internas no gene alvo, ou PCR em tempo real, onde uma molécula repórter é clivada a cada seqüência alvo amplificada, sendo a fluorescência emitida lida em tempo real. Em diagnósticos de infecções virais, onde a quantidade de material na maioria das vezes é muito diminuta e é importante que se quantifique a carga viral como monitoramento biológico, a técnica de PCR em tempo real é empregada com sucesso.^{39,40}

Para avaliar a formação de colágeno e evidenciar a neoformação óssea, foram confeccionadas lâminas histológicas, e as imagens foram analisadas em um software específico Image-Pro Plus 6.1. Com este programa, selecionamos a área de interesse e o próprio programa fez a contagem da área por número de pixel. A área tratada é comparada com a área não tratada (que é definida como controle de 100% de neoformação óssea), adjacente a área tratada, com comprimento e larguras similares à da área tratada analisada da mesma lâmina histológica.

Burkitt *et al*,⁴¹ afirmaram que a neoformação óssea ocorre tanto intramembranosa como endocondral. No local da fratura óssea, forma-se um coágulo sangüíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno. Este tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Células diferenciadas em condroblastos substituem o tecido granuloso fibroso com cartilagem hialina, formando um calo provisório que é flexível. Este calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa.

Desta forma, os resultados das análises histológicas, indicam que houve formação de colágeno evidenciando a neoformação óssea, tanto para o grupo tratado como para o controle. Porém não indicam que esta formação possa ter sido influenciada pelos tratamentos propostos, haja visto não ter apresentado resultados significativos entre as propostas de tratamento.

5 CONCLUSÕES

- a) as células mononucleares da medula óssea não aderiram ao defeito crítico criado no fêmur do rato;
 - b) Não foi possível avaliar a eficiência relativa dos tratamentos propostos no reparo ósseo, uma vez que não houve diferenças significativas na avaliação dos grupos.
-

REFERÊNCIAS

1. Rose, FR et al. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:1-7.
 2. Cancedda, R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003;22:81-91.
 3. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;263:30-48.
 4. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, George KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.
 5. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.
 6. Lenharo A. Plasma rico em plaquetas. *Rev Catarinen Implantodonto.* 2001;1:6-8.
 7. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
 8. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebeilatto C, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto agudo do miocárdio. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2003;20:270-8.
 9. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-209.
 10. Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res.* 2003;34:600-6.
-

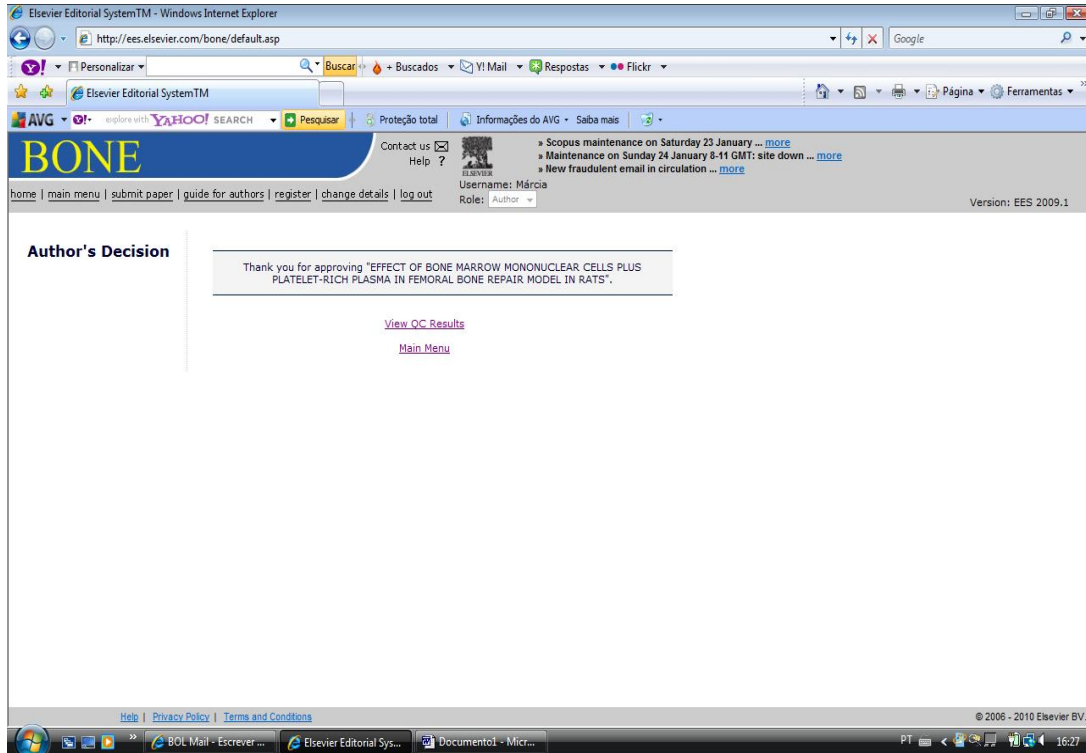
-
11. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005;57:874-82.
 12. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003;85:283-9.
 13. Plakachova et al. The bone regenerative effect of PRP in combination with on osteoconductive material in rat cranial defects. *Clinical Oral Implants Research.* 2006. 17:305-11.
 14. Rossi R et al. Utilização de plasma rico em plaquetas – proposta de um protocolo simplificado. Disponível em www.dentalnet.com.br , acesso em agosto de 2009.
 15. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.
 16. Kohn DF, Benson GJ et al. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Academic Press: New York,. 1997;Chapter 15.
 17. Meinel, L., O. Betz, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* 2006;39:922-31.
 18. Hau Jann et al. Handbook of Laboratory Animal Science. 2005; v. 3. Editora CRC Press.
 19. Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145:1301-8.
 20. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology.* 1992;24:17-27.
 21. Junior JW. Análise histopatológica comparativa das cápsulas de implantes de espumas de silicone e poliuretano em ratos. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.*. 2007;22:19-23.
-

-
22. Barroco RS. et al. Pé plano adquirido do adulto por disfunção do tendão do tibial posterior: avaliação clínica, imagenológica e morfométrica. Rev Bras Ortop. Vol. 33, Nº 7 – Julho, 1998.
 23. Santana IS. Processo de Reparo de Cavidade Óssea Cirúrgica Preenchida ou não com Plasma Rico em Plaquetas: Estudo Radiográfico em Calvária de Coelhos. Rev Bras Implantodon Prótese sobre Implante. 2006;13:51-60.
 24. Vacanti, JP et al. Beyond transplantation. Arch. Surg. 1998; 123:545-49.
 25. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10:165-81.
 26. Weibrich G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. Bone. 2004;34:665-71.
 27. Sarkar MR. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen and platelet-rich plasma (PRP) an immunohistochemical analysis. Biomaterials. 2006;27:1817-823.
 28. Xu SW. et al. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. Chin J Traumatol. 2003;6:160-66.
 29. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone. 1998;22:591-603.
 30. Lynch SE. et al. The effects of short-term application of a combination of plaquelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontal. 1991;62:458-67.
 31. Garg AK et al. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. Dental implantol Update 2000;11: 41-7.
 32. Landesberg R et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet- rich plasma gel preparation. J Oral Maxilofac Surg. 2000;297-300.
-

-
33. Boyan, B D *et al.* Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg.* 1999;26:4:629-41.
 34. Kunlin, J.; S. Vunjuan; X. Lin; O. M. Xiao; J. Childs; A. peel; A. logvinova; S. Banwait & D. A. Greenberg. Comparison of ischemi directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiology of disease.* 2005;18:366-74.
 35. Larsson, L. C.; H. Frielingsdorf; B. Mirza; S. Hansson; P. Anderson; K. A. Czech; M. Strandberg & H. Widner. Porcine Neural Xenografts in Rats and Mice: Donor Tissue Development and Characteristics of Rejection. *Experimental Neurology.* 2001;172:100-14.
 36. Irons H; J.G. Lind; C. G. Wakade; G. Yu; M. Hadman; J. Carroll; D. C. Hess & C. V Borlongan. Intracerebral Xenotransplantation Of Gfp Mouse Bone Marrow Stromal Cells In Intact And Stroke Rat Brain: Graft Survival And Immunologic Response. *Cell Transplant.* 2004;13:283-94.
 37. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-20.
 38. Payushima OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol.* 2006;33:2-18.
 39. Lopes, BPT; P. R. Rezende; L. M. C. Maradei-Pereira & J. A. R. De Lemos. Carga Proviral Do Htlv-1 E Htlv-2: Um Método Simples Atraves da PCR Quantitativa Em Tempo Real. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical.* 2007;39:548-52.
 40. Cunha, DM. C.; A. M. T. C. Silva; M. P. *et al.* Detecção do Genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino celular da laringe: Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real. *Rbac.* 2007;39:255-57.
-

41. Burkitt PR, Young B, Heath J.W. Tecidos esqueléticos. Wheater Histologia Funcional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1994;173-86.
-

ANEXO D – ACEITE DA REVISTA BONE



Submissions Being Processed for Author Márcia Illana Kopschina

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View QC Results Send E-mail		EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PLUS PLATELET-RICH PLASMA IN FEMORAL BONE REPAIR MODEL IN RATS	Jan 21, 2010	Jan 21, 2010	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

ANEXO E – ARTIGO EM INGLÊS

Elsevier Editorial System(tm) for Bone
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PLUS PLATELET-RICH PLASMA IN FEMORAL BONE REPAIR MODEL IN RATS

Article Type: Original Full Length Article

Keywords: KEYWORDS: critical defect, femur, PRP, TGF- β 1,rats

Corresponding Author: Mrs. Márcia Illana Kopschina,

Corresponding Author's Institution: PUCRS

First Author: Márcia Illana Kopschina

Order of Authors: Márcia Illana Kopschina; Daniel R Marinowic; Caroline P Klein; Camilla A Araújo; Tiago A Freitas; Gabriela Hoff; Jeferson B Silva

Abstract: ABSTRACT

BACKGROUND: Mononuclear cells from bone marrow have been used in various treatments of disease in an attempt to regenerate tissues. The objective of this study was to evaluate the accession and proliferation of mononuclear cells in a critical defect, with the addition of platelet-rich plasma (PRP) and / or TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), and then to evaluate bone repair at defective sites on the femurs of rats.

METHODS: We created a critical defect on the bilateral femurs of 33 Wistar-Kyoto rats.. Mononuclear bone marrow cells, TGF- β and PRP were added to the lesion on the treated side and saline on the contralateral side. We determined the adhesion of mononuclear cells at the critical defect and bone repair.

RESULTS: The presence and consequent adhesion of the mononuclear cells administered to the treated animals was not demonstrated by PCR. Radiographic analysis showed closure of the lesion, but we could not affirm that this resulted from the treatments administered or by normal bone regeneration itself, when the lesion was evaluated at 6 and 10 weeks postoperative, seeing that there were no significant differences between the groups.

CONCLUSIONS:

- a) Bone marrow mononuclear cells did not adhere at the critical defect created in the rat femur;
- b) It was not possible to determine the efficiency of the bone repair treatments studied, as the results did not show significant differences between the groups.

Suggested Reviewers: Lynda F Bonewald
University of Missouri at Kansas City School of Dentistry, Kansas City, MO, USA
bonewaldl@umkc.edu

Mary L Bouxsein

Musculoskeletal Sciences, Genetics Institute, Cambridge, MA
mbouxsein@genetics.com

Opposed Reviewers:

Dear Editor,

We would like to submit the manuscript entitled "**EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PLUS PLATELET-RICH PLASMA IN FEMORAL BONE REPAIR MODEL IN RATS**"

This work was developed on Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, and Post-Graduate Medicine and Health Sciences at PUCRS.

We appreciate if you could consider this paper to be published in Bone and we hope that the paper can be suitable for publication.

Yours sincerely,

Márcia I. Kopschina
Medicine in Health and Science
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga, 6681/Buil 12 Room 202 – CEP 90619-900- Porto Alegre – Brazil
E-mail: kopi@uol.com.br

Porto Alegre, January 19th, 2010.

EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS PLUS PLATELET-RICH PLASMA IN FEMORAL BONE REPAIR MODEL IN RATS

Marcia I. Kopschina¹, Daniel R. Marinowic³, Caroline Peres Klein⁴, Camilla Assad Araújo⁴,
Tiago Alexi Freitas⁴, Gabriela Hoff², Jefferson Braga da Silva^{1,4}

1 Post-Graduate Medicine and Health Sciences, PUCRS

2 School of Physics, PUCRS

3 Institute for Biomedical Research, PUCRS

4 Laboratory of Medical Skills and Surgical Research, PUCRS

ABSTRACT

BACKGROUND: Mononuclear cells (MCs) from bone marrow have been used in various treatments of diseases in an attempt to regenerate tissues. The objective of this study was to evaluate the access and proliferation of mononuclear cells in a critical defect, with the addition of platelet-rich plasma (PRP) and / or TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), and then to evaluate bone repair at defective sites on the femurs of rats.

METHODS: We created a critical defect on the bilateral femurs of 33 Wistar-Kyoto rats. Mononuclear bone marrow cells, TGF- β and PRP were added to the lesion on the treated side and saline on the contralateral side. We determined the adhesion of mononuclear cells at the critical defect and bone repair.

RESULTS: The presence and consequent access of mononuclear cells administered in the treated animals were shown by the PCR technique. Radiographic analysis showed closure of the lesion groups in MCs + TGF- β and MCs + PRP, however, we can not say whether the treatment was administered or by the bone regeneration, when analyzed at 6 and 10 weeks, there is seen not differ substantially between groups.

CONCLUSIONS:

- a) Bone marrow mononuclear cells did not adhere at the critical defect created in the rat femur;
- b) It was not possible to assess the relative efficiency of the proposed treatments on bone healing, since no significant differences in the evaluation of groups.

KEYWORDS: femur, PRP, TGF- β 1, MCs, rats

1 Márcia Illana Kopschina , Summary of Dissertation submitted to the Post-Graduate Medicine and Health Sciences, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, to obtain the title of Master of Medicine and Health Sciences. Area of concentration: Surgical Clinic. e-mail: kopi@uol.com.br
Correspondence to: May 24, 1333 apt 301, Bairro Vila Rosa, Novo Hamburgo, RS, Brazil. ZIP 93315-120.

Daniel R. Marinowic, Biologist, MSc in Neuroscience, Center for Cellular Therapy, Laboratory of Neuroscience, Institute of Biomedical Research, PUCRS, Avenida Ipiranga, n / 6690, 2 ° andar, ZIP 90610-000, Porto Alegre / RS, Brazil. e-mail: daniel.marinowic@pucrs.br

Caroline Peres Klein, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga
6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil, ZIP: 90619-001.
e-mail: carolpkl@gmail.com

Camilla Araújo Assad, Medical Student PUCRS, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil ZIP: 90619-001. e-mail: Camilla_assad@hotmail.com

Tiago Alexi Freitas, Medical Student PUCRS, Laboratory Skills and Medical Surgical Research, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Prédio 64 - Botanical Garden Porto Alegre / RS, Brazil ZIP:
90619-001.e-mail:talexih@hotmail.com

Profa. Gabriela Hoff, PhD in Nuclear Biosciences - Medical Physics, Faculty of Physics, PUCRS, Avenue Ipiranga, 6681/P10-207, Porto Alegre, RS, Brazil. e-mail: ghoff@pucrs.br

Prof. Jefferson Braga da Silva, Lecturer in Surgery of the Hand, UNIFESP, Adjunct Professor, School of Medicine, Catholic University of Rio Grande do Sul. Coordinator of the Medical and Surgical Research of the Skills Laboratory PUCRS. Coordinator of Concentration in Surgery, Graduate Program in Health Sciences, PUCRS, Av Ipiranga 6690, conj. 216, Clinical Center, PUCRS, Botanical Garden, ZIP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil e-mail: jeffmao@terra.com.br

1 INTRODUCTION

The possibility of the regeneration of tissues and organs has been the subject of research over the years. Thus, new areas of medicine are investigating techniques for tissue regeneration from natural regulators (growth factors) and components of the organism itself (stem cells)¹.

Two approaches of particular interest to researchers are pursued for the advancement of the scientific basis of clinical application, creating new parameters for the production of tissues and the development of procedures for tissue repair and regeneration *in vivo*, as well ².

Bone tissue is constantly in a dynamic morphological process following its original formation. Thus, bone metabolism is maintained by a constant process of bone resorption and formation in response to physical and biomechanical changes. This event is controlled by two mechanisms: local and systemic regulation, through hormones that control the levels of calcium and phosphate. In addition, there are growth factors that act on all cells of the bone structure aiding in tissue repair³⁻⁵.

Platelet-rich plasma (PRP) is a product of the laboratory processing of autologous blood, and its therapeutic strategy is to accelerate wound healing through the concentration of growth factors present in platelet cytoplasm, which are universal indicators of almost all wound healing events⁶ and free from toxic characteristics or immunoreactivity³.

Studies described in the literature have shown that in the fraction of mononuclear cells obtained from bone marrow, umbilical cord and other tissues, there are both hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells^{7,8}. The hematopoietic stem cells give rise to all the different cells of the blood, and are characterized by the membrane protein CD34. The mesenchymal stem cells give rise to cells that will form the other tissues of the body, and they express the membrane markers CD105 (endoglin) and CD117 (c-kit)⁹⁻¹¹. Thus, it is possible to select the specific cell populations most suitable for the regeneration of the tissue of interest.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

We used for this study 39 outbred Wistar-Kyoto rats, weighing between 200 and 250 g. Six male rats were used as bone marrow donors and 33 females rats, used for the intervention protocol. The rats were obtained from the animal facility of PUCRS; they were housed in individual cages and received water and food ad libitum. The rats were kept on a 12-h light/dark biological cycle.

2.2 Description of growth factors used in the protocol and their origin.

a) TGF- β 1 - Transforming growth factor beta 1 in the protocol.

The product was purchased from Biosource Laboratory and had a purity of >98%. It was reconstituted with sterile distilled water to a concentration of 50 mg/mL. We used a concentration of 6 ng/mL of TGF- β 1 in a volume of 30 μ L adapted so that there was no leakage of fluid in the critical defect created¹².

b) Isolation of PRP (platelet-rich plasma) from the carotid artery of rats via cardiac puncture.

PRP was isolated by cardiac puncture, according to the protocol of Plachokova et al.¹³ and the PRP fraction was purified as described by Rossi et al¹⁴.

We used 30 μ L of PRP in the critical defect created¹⁵. A hemogram was performed in order to determine the number of platelets present in the PRP samples from 3 rats used for the treatment procedures. An automated Coulter STKS counter, at Hospital São Lucas from PUCRS, was used according to the manufacturer's instructions. A 150 μ L aliquot of each PRP sample was counted and showed the following results:

- Animal group 1 - platelets in PRP = 1,650,000 (1,650 103/uL)
- Animal group 2 - platelets in PRP = 2,247,000 (2,247 103/uL)
- Animal group 3 - platelets in PRP = 2,280,000 (2,280 103/uL)

c) Isolation of mononuclear cells from rat bone marrow.

MCs were isolated from the bone marrow donor (1 male rat for each study group) after sacrificing the animal with intracardiac overdose of thiopental (2 mL, equivalent to 100mg /kg rat). The mononuclear fraction of bone marrow was obtained by flushing the femurs, tibiae, humeri and ulnae of animals. We collected the bones, and after they were washed with DPBS solution (Gibco ®, USA), bone epiphyses were cut. The extraction of bone marrow stroma was obtained by the introduction of a 32 G needle in the bone ends, and the cavities later washed with heparinized DPBS. The content was centrifuged at 1500 rpm and resuspended in RPMI 1640 (1:1) (Gibco ®, USA). This suspension was fractionated in a density gradient centrifugation using 1.191 g/L Histopaque ® (Sigma-Aldrich ®, USA) at 400 g for 30 min at 25 °C. The mononuclear fraction located at the interface with Histopaque ® was collected and washed twice with saline. Cell viability was determined by trypan blue exclusion (Trypan Blue Stain 0.4%; Gibco ®, USA), indicating 99% viable cells. Aliquots of 30µL containing 106 cells were designated for each animal for application to the critical defect created.

2.3 Protocol establishing the critical defect

Anesthesia was induced with the animal under restraint and in the supine position. Anesthetics were administered intraperitoneally using an insulin needle and syringe. The rats were given ketamine hydrochloride (80-100 mg/mL_kg combined with chlorpromazine hydrochloride (1.6 mg – 2 mg/mL_kg)¹.

A 5 mm critical defect was created in the femurs bilaterally, following the protocol of Meinel et al¹⁷. The rats used for this study were divided into 3 groups of 11 rats each, where the control procedures and treatment were performed in the same rat. The animals were under anesthesia, as described

above, and after confirming the effect of anesthesia, the hind legs were shaved.

For treatment, animals were placed on their side and a transverse incision was made, about 2 cm with a Carbon Steel 15 scalpel blade (Feather Safety Razor Co., LTD), on the right and left thigh. To expose the femur, the biceps femoris muscle was retracted posteriorly as the gluteus maximus, tensor fascia lata and vastus lateralis were retracted anteriorly. We used a retractor to expose the bone.

Next, the periosteum was detached using a 19cm Freer (Neumar). A long carbide drill, No. 8, was connected to a high-speed Dental Beltec Mini™ motor (maximum speed of 15,000 rpm drive) to drill the femur while the tissue was manually irrigated with saline and drained with a Nevoni Vacuum Aspirator™.

The critical defect was in the cavity of the medial diaphysis, the between the rough line and third trochanter of about 5 mm long by 2.5 mm wide and deep enough to reach the medullary canal¹⁷ for application of mononuclear cells and the mixture of PRP/TGF- β in the right femur and saline in the left femur. Each treatment led to a study group:

- Group 1 - use of MC with 30 μ L transforming growth factor beta (TGF- β);
- Group 2 - use of MC with 30 μ L PRP (platelet-rich plasma);
- Group 3 - use of MC with 30 μ L transforming growth factor beta (TGF- β) and 30 μ L PRP (platelet-rich plasma);

Next was a simple suture with a Mayo-Hegar Videa tipped needle holder and Ethilon No. 5 mononylon suture of Ethicon™. The suture was performed in compliance with the structure. First was the sternum periosteum, followed by the union of the muscle layers and, finally, the skin tissue. The same suture procedure was performed the left side.

Postoperatively, in the first 24 h, we used as analgesia ketoprofen 5 mg/kg subcutaneous¹⁸. After 48 h, 200 mg/mL paracetamol was used as

analgesia with a dose of 1 mL/20mL of H₂O, equivalent to a dose of 125 to 150 mg paracetamol/day.

2.4 Radiographic examinations to follow bone growth in lesions

To carry out the images, we selected the mammography equipment Mamomat 3000 Siemens with FUJI CR technology. We used the image transducers Image Plate (IP) FUJI specific for mammography. The technology applied to mammography was selected given the size characteristics of the rats and contrast of the image for later analysis. An FCR Profect CS FUJI reader (model CR-IR 363) was used for image processing.

The radiographic technique used consisted of a Mo-Mo anode-filter combination at tube accelerating voltage of 28 kVp, and 14 mAs (an appropriate technique for imaging the lesion in the femur of these animals). The X-ray was taken with each rat placed in the central area of irradiation in the ventral decubitus position. After reading the IP, the images were saved in dicom format, identifying the group and the number of animals in each dataset collection, as well as weeks of treatment (the sixth or tenth).

2.5 Euthanasia

The animals were sacrificed 10 weeks after surgical treatment, following the protocol of Kohn *et al.*¹⁶, for later histological analysis. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Use - CEUA / PUCRS.

2.6 Identification of the DNA of mononuclear cells - DNA extraction

DNA extraction was performed with phenol / chloroform based on the method described by Isola *et al*¹⁹.

2.7 Molecular analysis– PCR

The cells administered to the lesions were identified using the polymerase chain reaction technique (PCR), following the protocol described by Mullis, Kary²⁰.

2.8 Histochemistry

2.8.1 Sirius histological technique for collagen

For histological technique was used the picosirius technique, which is a specific histochemical method for the detection of structures composed of oriented collagen molecules²¹. The picosirius method causes large amounts of molecules of Sirius Red with acid character and elongated, to be placed in parallel with the collagen molecules, which causes considerable increase in birefringence of collagen fibers when observed under polarized light²².

2.8.2 Technical coloring

The femurs were decalcified with 5% formic acid in DPBS. The dehydrated material was embedded in paraffin using a Leica TP 1020 tissue processor. The femurs were embedded in paraffin and 5µm sections of the lesion were made using micrometer Olympus CUT 4060. The material was placed in an oven at 60 °C overnight. Afterward, they were deparaffinized (xylene 2X for 5 min, absolute alcohol - 4X for 2 min) and hydrated in water. We then carried out the incubation with 1% solution of picosirius staining for one hour followed by washing in running tap water for 20 min. The slides were dehydrated and mounted with Canada balsam. The images of histological sections were captured by a video camera mounted on an

Olympus BX40 microscope and analyzed with the aid of the software Image Pro-Plus 6.1, as shown in Figures 1 and 2, treated group and control group.

FIGURES 1 and 2

3 STATISTICAL ANALYSIS

The results of the X-ray images were analyzed using ANOVA (one way). The comparison of the times was performed by Student's t test. The level of significance was $p < 0.05$ as statistical difference and statistical power of 95%. The data were analyzed using SPSS 14.0. The data analysis for both radiography and histology were entered into a spreadsheet (Microsoft Office Excel 2003).

4 RESULTS

4.1 Radiographic evaluation

The radiographic evaluation in the postoperative period between 6 and 10 weeks showed different results between the three treatment groups.

As can be seen in the graphs in Figures 3 and 4 for both length and for the area, there was closure of the lesion in both the control bone and the treated bone in all treatments. In most of the data, the mean \pm SD calculated does not include the entire set of measurements, which shows a large fluctuation of the data for the proposed method.

In Figure 3, it was observed that the groups MC+TGF- β /MC + PRP did not show any statistical difference. There is an indication for these groups that the treatment is a better option than the control.

However, the group MC + PRP + TGF- β showed an anomalous behavior where the treated group showed worse performance than the control. Thus, there is a strong indication that this treatment is not indicated for stimulation of bone healing.

The same behavior was observed for the analysis presented in Figure 4, considering the length of the lesion, where the unexpected performance of group MC + PRP + TGF- β can be explained based on the report of Santana²³.

FIGURES 3 AND 4

Figures 5 and 6 showed that the rate of reduction of area and length of the lesion intercomparing the groups against time. In these graphs, the reduction rate is significantly negative for the group MC + PRP + TGF- β , which shows better closure for the control group. This group showed an average rate of -18.6%. For the other groups, MC + TGF- β and MC + PRP, the average reduction rate was 17.2% and 12.7%, respectively.

Group 2, MC + PRP, performed better with the rate of reduction being 66% greater in treatment than in control. Group 1, MC + TGF- β , showed a reduction rate of 62% better in treated than in control.

Group 3, MC + PRP + TGF- β showed a reduction rate of 66% better in control compared to treatment, which indicates that this treatment effectively inhibits bone repair.

The same behavior was observed with the length of the lesion where group 1 and 2 had on average 9.8% and 12.3% reduction, respectively, while group 3 showed 10.6% bone repair in the lesion, when inter-comparing control with treated bone.

Moreover, the average reduction rate for the three groups was approximately 0.923%, which is not statistically significant between the control and treated bone.

FIGURES 5 AND 6

Figure 6 (a) group 1, MC + TGF- β was observed that the 9 animals in this study, 6 had a closure of the critical defect in the treated femur more than in the control femur. This group had two animals with fractures of the femur, where they were excluded from the study.

In Figure 6 (b), group 2, MC + PRP showed that of the 10 animals of the study, 5 showed a greater closure of the critical defect in the control group. In this group, 1 animal had a fractured femur, which was excluded from the study.

Figure 6 (c) group 3, MC + PRP + TGF- β was observed that the 9 animals in this study, 2 animals showed a greater closing the control group, and 4 animals showed the same result in the closure of the critical defect . This group presented the worst results compared pairwise. In group 2 animals had a fractured femur, which was excluded from the study.

In general, this graph shows the femur control and treated according to the time and the rate of the control group and treated.

4.2 Adhesion of mononuclear cells

The presence and subsequent adhesion of mononuclear cells administered to the treated animals was determined by PCR using primers complementary to the sequence of the marker gene TSPY.

4.3 Histological evaluation using picosirius technique

The evaluation was made on a sample of animals per group at 10 weeks postoperative. The evaluation of histological slides showed new bone formation, with the presence of collagen for both the control and treated femurs.

With the aid of Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Inc.), the area corresponding to the bone of each image was selected. In the bone area of the image, with normal bone tissue expressed as 100% neoformation (ideal) for comparison, we calculated the percentage of bone neoformation of the

treated area compared to normal bone. Based on the number of specimens used in this study, the groups tested showed no statistically significant differences in the percentage of new bone formation promoted by these treatments compared to control, as shown in Figure 7.

FIGURE 7

We note that the graph of Figure 7 (a) represents the group MC + TGF- β relating the adjacent area to the control. The same showed a greater formation of collagen in the control, $p = 0.172$. In Figure 7 (b) for the same group, there was very similar formation of collagen in the adjacent area and the area treated, $p = 0.967$. Looking at the treated area compared to control, as shown in Figure 7 (c), we observed that the formation of collagen in the treated femur was lower than in the control, $p = 0.228$.

The same analysis was done with group MC + PRP. As shown in Figure 7 (d), correlating the adjacent area and control area, the formation of collagen was lower than in the surrounding area with $p = 0.398$. In Figure 7 (e) of the same group, relating area and adjacent area treated, the formation of collagen was higher in the treated area, with $p = 0.378$. Figure 7 (f) shows the relationship between the treated area and control area, and the control area had a greater collagen formation.

Histological analysis indicated that both the treated group and the control group showed collagen neof ormation, but there was no difference between the treatments ($p = 0.296$).

5 DISCUSSION

According to Rose et al.¹, the Regenerative Medicine compose a new field that investigates tissue regeneration techniques from natural markers (growth factors) and components of the organism itself (stem cells).

A hip fracture contributes considerably to morbidity and mortality, especially in older patients due to pre-existing diseases and complications resulting from containment. Recent studies have shown that stem cells have

a great capacity to regenerate bone tissue, primarily in animal models and subsequently in patients with osteogenesis imperfecta.

As seen, the focus of this study was to evaluate the therapeutic potential of the mononuclear fraction of bone marrow cells and the effectiveness of platelet-rich plasma (PRP) and transforming growth factor (TGF- β) in bone repair.

About four decades ago, it was discovered that hematopoietic cells have the potential to differentiate into many different cell types²⁴.

For this study, we used mononuclear cells obtained from bone marrow, a technique already used in clinical practice, which has low costs and allows for easy retrieval.

Krebsbach et al²⁵ stated that the bone marrow stroma consists of a heterogeneous population of cells that provides hematopoietic cells with structural and physiological support. This stroma contains cells with characteristics of stem cells that differentiate into bone, cartilage and adipocytes, as well as supporting hematopoietic tissues.

The animals used in this study, Wistar-Kyoto rats, were genetically identical, avoiding any risk of rejection of the cells used. In the last decade, there has been emphasis on growth factors, with PRP and TGF- β being used in clinical practice.

Most previous studies using PRP report conflicting results on the effect on wound healing at the critical defect²⁶⁻²⁷. One of the reasons for these contradictions may be the method of purification which is crucial to experimental success.

Santana et al²³ in a radiographic study in rabbit calvarium showed that PRP promoted increased bone density in the vicinity of the surgical cavity.

In our study, the proposed treatments presented different results. Groups 1 and 2, MC + TGF- β and MC + PRP, showed a positive closure of the lesion, but there was no indication that one treatment was better than the other. According to Xu²⁸, PRP together with TGF- β enhances healing in bone

formation in 2 weeks. After 6 weeks, a plateau is reached with a decrease in new bone formation.

In group 3, MC + PRP + TGF- β , there was a better closure in the control group, i.e., there was a faster rate of reduction in tissue damage in the control group. Sakou²⁹, in his study of rat femurs, found significantly elevated TGF- β levels in the control and animals treated with PRP. TGF- β was increased in treated bones, and at 4 weeks there was a significant increase in TGF- β in the control group. The authors suggested that at 4 weeks the bones treated with PRP activated the TGF- β stored in bone compared to control for acceleration of osteogenesis.

Lynch et al.³⁰ reported an increase in bone density around implants associated with growth factors contained in platelets, and in chemotaxis of cells involved in bone healing, including osteoblasts, an important function of the growth factors present in platelets³¹. This may explain the higher bone density found in areas adjacent to the surgical cavity.

Another event that can explain this finding is that when the PRP contracts, there is a supernatant rich in growth factors³². This supernatant can be spread around the critical defect treated with PRP inhibiting bone repair in the treated bone. This would explain why the control had a positive closure response in relation to the treated bone after 6 and 10 weeks, when analyzed by X-rays.

It is imperative, therefore, to establish conditions for bone tissue to regenerate in clinical situations considered inhospitable, such as in locations that have compromised blood supply, in areas of difficult healing, in regions that have defects with critical dimensions, or where the tissue is completely absent³³.

Histological analysis was performed to compare with the radiographic analysis. Regarding histology, some aspects can be pointed out as an explanation for not finding administered MC in treated bone; they are: non-adherence of the cells at the site of injury, immune response, volume of tissue sample analyzed and sensitivity of the technique.

Studies by Kunlin et al.³⁴ showed that all routes of administration of stem cells resulted in migration to the site of injury. Some studies suggest that the use of immunosuppressive drugs is a determining factor for long-term survival of stem cells administered³⁵. There are factors that contribute to the extent of rejection, including the type of cell transplanted, the immunologic disparity between donor and recipient, and when and where the cells are administered³⁷. However, even in the absence of immunosuppression, transplanted cells can migrate to and survive in damaged areas³⁶.

Bone marrow contains hematopoietic stem cells³⁷, which in vitro can be easily separated from the CTM. However, Payushima et al. found in their study that these cells showed no adhesion capacity because they are easily separated during changes in cell culture medium³⁸.

PCR produces an exponential amplification of a specific target sequence. If adhered, the amount of transplanted cells in host tissue, and therefore the amount of DNA, even if amplified, can be minimal for the reaction. Therefore, the amplified DNA may not be viewable on a 2% agarose gel. Some more sensitive techniques could be used such as nested PCR, where a new PCR reaction is applied to the PCR product already amplified using primers flanking the innermost regions in the target gene, or real-time PCR, where a reporter molecule is cleaved each time a target sequence is amplified with fluorescence read in real time. In the diagnosis of viral infections, where the amount of material in most cases is very small and where it is important to quantify the viral load in biological monitoring, the technique of real-time PCR is used successfully^{39,40}.

To assess the formation of collagen and highlight new bone formation, histological slides were prepared and images analyzed using specific software, Image-Pro Plus 6.1. With this program, we selected the area of interest and the program assessed the area based on the number of pixels. The treated area was compared with the untreated area (which was defined as 100% control of bone formation) adjacent to the treated area, with length

and width similar to the treated area and analyzed in the same histological slide.

Burkitt *et al*⁴¹. stated that the new bone formation occurs both in an intramembranous and endochondral manner. At the site of bone fracture, a blood clot forms which is subsequently replaced by collagen tissue. This tissue becomes progressively more fibrous. Cells differentiated into chondroblasts replace granular fibrous tissue with hyaline cartilage, forming a provisional callus that is flexible. This callus is strengthened by the deposition of calcium salts in the cartilage matrix. Histological analysis indicates that there was evidence of collagen formation in bone formation, both in the treated group and the control. However, it did not indicate that this bone formation may have been influenced by the treatments studied, because there were no significant differences between control and treated bone.

CONCLUSIONS:

- a) Bone marrow mononuclear cells did not adhere at the critical defect created in the rat femur;
 - b) It was not possible to assess the relative efficiency of the proposed treatments on bone healing, since no significant differences in the evaluation of groups.
-

REFERÊNCIAS

- [1] Rose, FR et al. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:1-7.
- [2] Cancedda, R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003;22:81-91.
- [3] Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;263:30-48.
- [4] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, George KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.
- [5] Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.
- [6] Lenharo A. Plasma rico em plaquetas. *Rev Catarinen Implantodonto.* 2001;1:6-8.
- [7] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
- [8] Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebeilatto C, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto agudo do miocárdio. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2003;20:270-8.
- [9] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355:1199-209.
- [10] Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res.* 2003;34:600-6.
- [11] Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005;57:874-82.
- [12] Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003;85:283-9.
- [13] Plakachova et al. The bone regenerative effect of PRP in combination with on osteoconductive material in rat cranial defects. *Clinical Oral Implants Research.* 2006. 17:305-11.
- [14] Rossi R et al. Utilização de plasma rico em plaquetas – proposta de um protocolo simplificado. Disponível em www.dentalnet.com.br, acesso em agosto de 2009.
- [15] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.
- [16] Kohn DF, Benson GJ et al. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Academic Press: New York,. 1997;Chapter 15.
- [17] Meinel, L., O. Betz, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone.* 2006;39:922-31.
- [18] Hau Jann et al. Handbook of Laboratory Animal Science. 2005; v. 3. Editora CRC Press.
- [19] Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145:1301-8.

- [20] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
- [21] Junior JW. Análise histopatológica comparativa das cápsulas de implantes de espumas de silicone e poliuretano em ratos. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.* 2007;22:19-23.
- [22] Barroco RS. et al. Pé plano adquirido do adulto por disfunção do tendão do tibial posterior: avaliação clínica, imagenológica e morfométrica. *Rev Bras Ortop*. Vol. 33, Nº 7 – Julho, 1998.
- [23] Santana IS. Processo de Reparo de Cavidade Óssea Cirúrgica Preenchida ou não com Plasma Rico em Plaquetas: Estudo Radiográfico em Calvária de Coelhos. *Rev Bras Implantodon Prótese sobre Implante*. 2006;13:51-60.
- [24] Vacanti, JP et al. Beyond transplantation. *Arch. Surg*. 1998; 123:545-49.
- [25] Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10:165-81.
- [26] Weibrich G. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34:665-71.
- [27] Sarkar MR. et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen and platelet-rich plasma (PRP) an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2006;27:1817-823.
- [28] Xu SW. et al. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chin J Traumatol*. 2003;6:160-66.
- [29] Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*. 1998;22:591-603.
- [30] Lynch SE. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontal*. 1991;62:458-67.
- [31] Garg AK et al. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dental implantol Update* 2000;11: 41-7.
- [32] Landesberg R et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;297-300.
- [33] Boyan, B D et al. Bone and cartilage tissue engineering. *Clin Plast Surg*. 1999;26:4:629-41.
- [34] Kunlin, J.; S. Vunjuan; X. Lin; O. M. Xiao; J. Childs; A. peel; A. logvinova; S. Banwait & D. A. Greenberg. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiology of disease*. 2005;18:366-74.
- [35] Larsson, L. C.; H. Frielingsdorf; B. Mirza; S. Hansson; P. Anderson; K. A. Czech; M. Strandberg & H. Widner. Porcine Neural Xenografts in Rats and Mice: Donor Tissue Development and Characteristics of Rejection. *Experimental Neurology*. 2001;172:100-14.
- [36] Irons H; J.G. Lind; C. G. Wakade; G. Yu; M. Hadman; J. Carroll; D. C. Hess & C. V Borlongan. Intracerebral Xenotransplantation Of Gfp Mouse Bone Marrow Stromal Cells In Intact And Stroke Rat Brain: Graft Survival And Immunologic Response. *Cell Transplant*. 2004;13:283-94.
- [37] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-20.

- [38] Payushima OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol.* 2006;33:2-18.
- [39] Lopes, BPT; P. R. Rezende; L. M. C. Maradei-Pereira & J. A. R. De Lemos. Carga Proviral Do Htlv-1 E Htlv-2: Um Método Simples Atraves da PCR Quantitativa Em Tempo Real. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical.* 2007;39:548-52.
- [40] Cunha, DM. C.; A. M. T. C. Silva; M. P. et al. Detecção do Genoma de HPV em pacientes com carcinoma espino celular da laringe: Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real. *Rbac.* 2007;39:255-57.
- [41] Burkitt PR, Young B, Heath J.W. Tecidos esqueléticos. *Wheater Histologia Funcional.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1994;173-86.
-

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

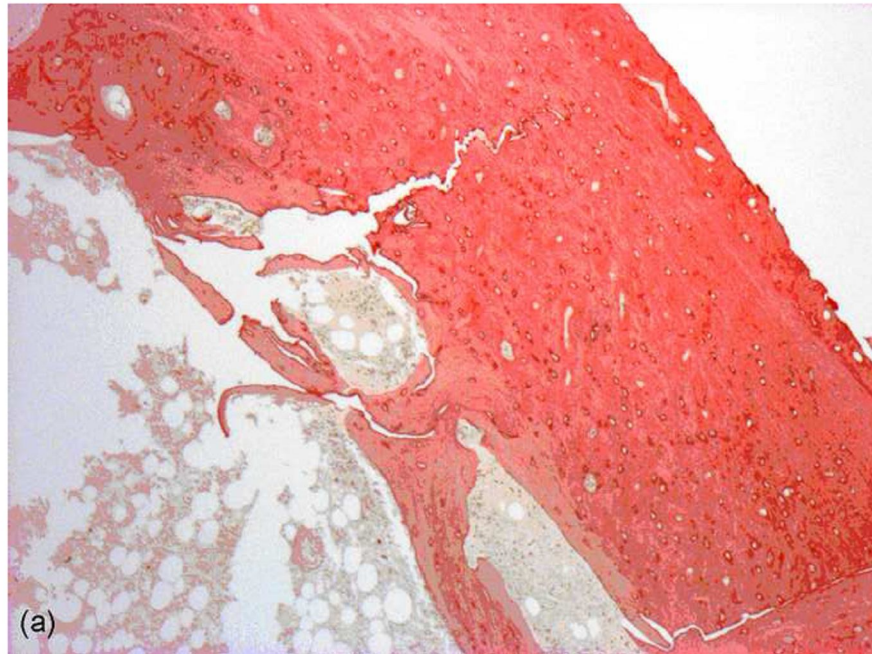


Figure 1(a): Picture of histological slide stained with picosirius of polarization of the femur of rats treated according group MC + TGF- β . Increase 50X.

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

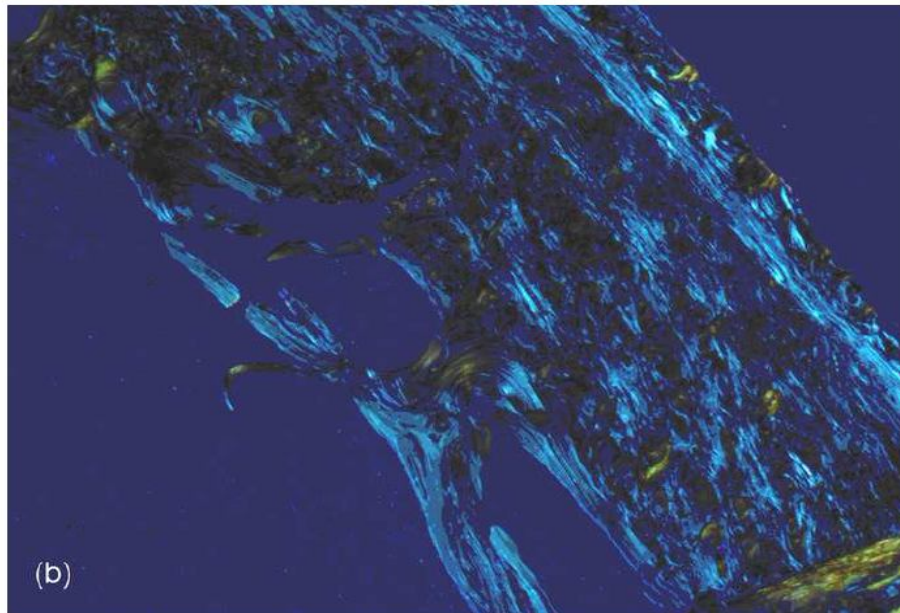


Figure 1(b): Picture of histological slide stained with picosirius polarization of the femur of rats treated according group MC + TGF- β . Increase 50X.

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

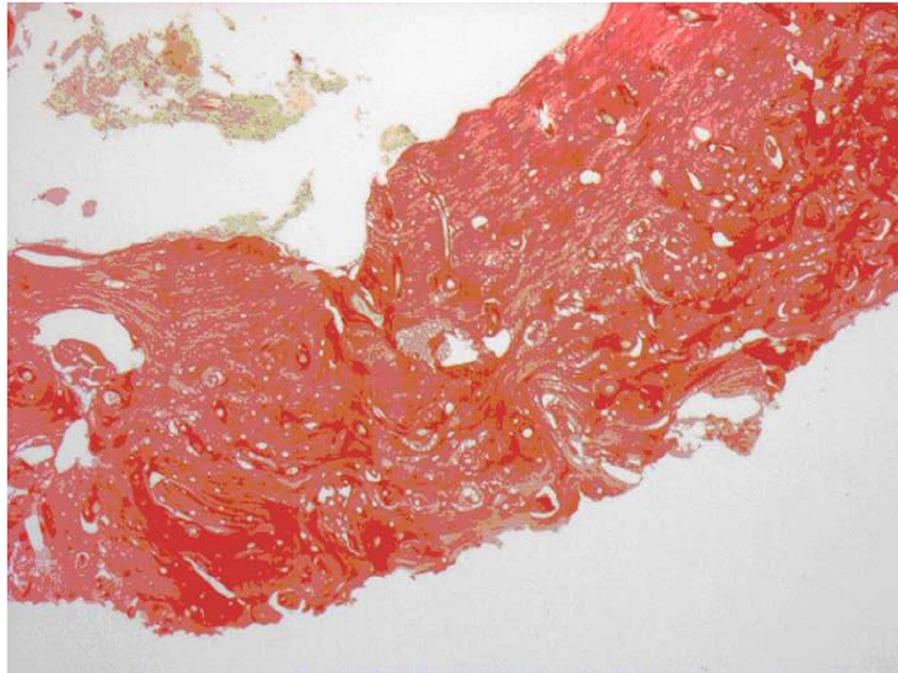


Figure 2(a): Picture of histological slide stained with picrosirius of the femur of rats treated according group MCs + PRP. Increase 50X.

Figure(s)
[Click here to download high resolution image](#)

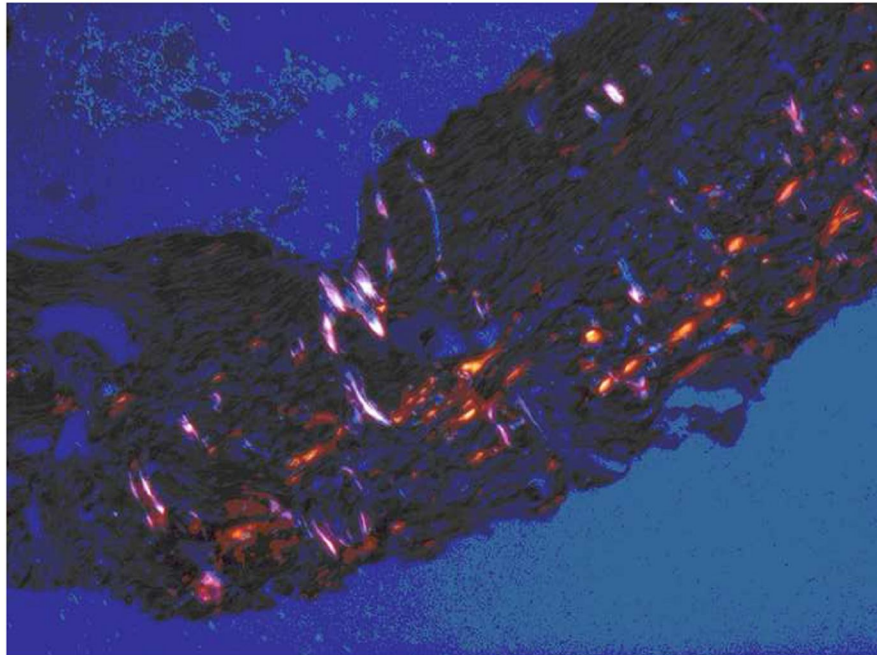


Figure 2(b): Picture of histological slide stained with picrosirius of the femur of rats treated according group CMs + PRP. Increase 50X.

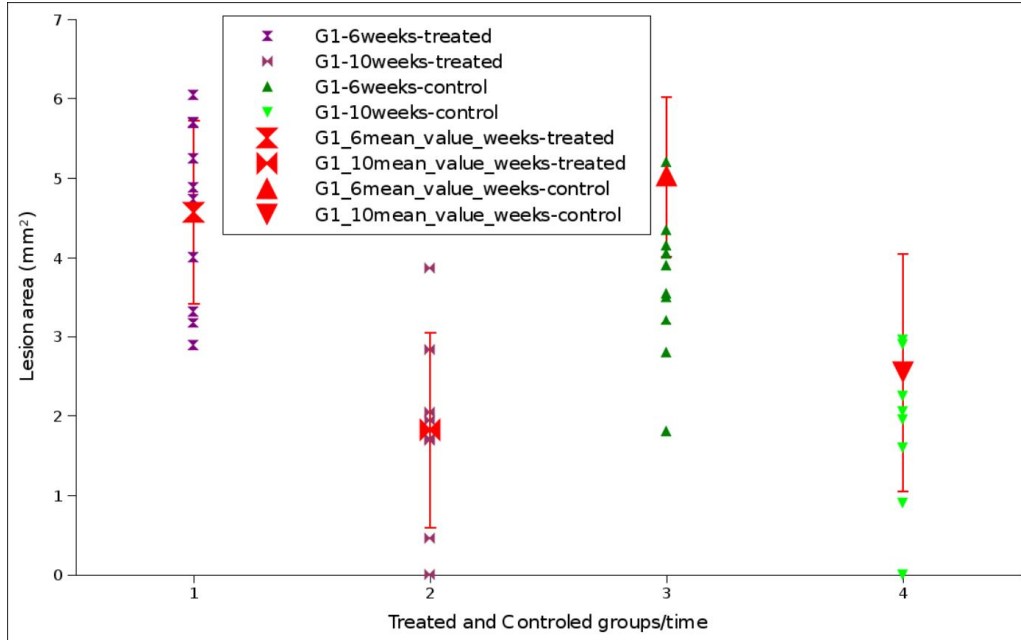


Figure 3: Charts of the closure development of the lesion area for 6 and 10 weeks of treatment and treated groups and their mean values and standard deviations for (a) MC + TGF- β , (b) MC + PRP group and (c) group MC + PRP + TGF β .

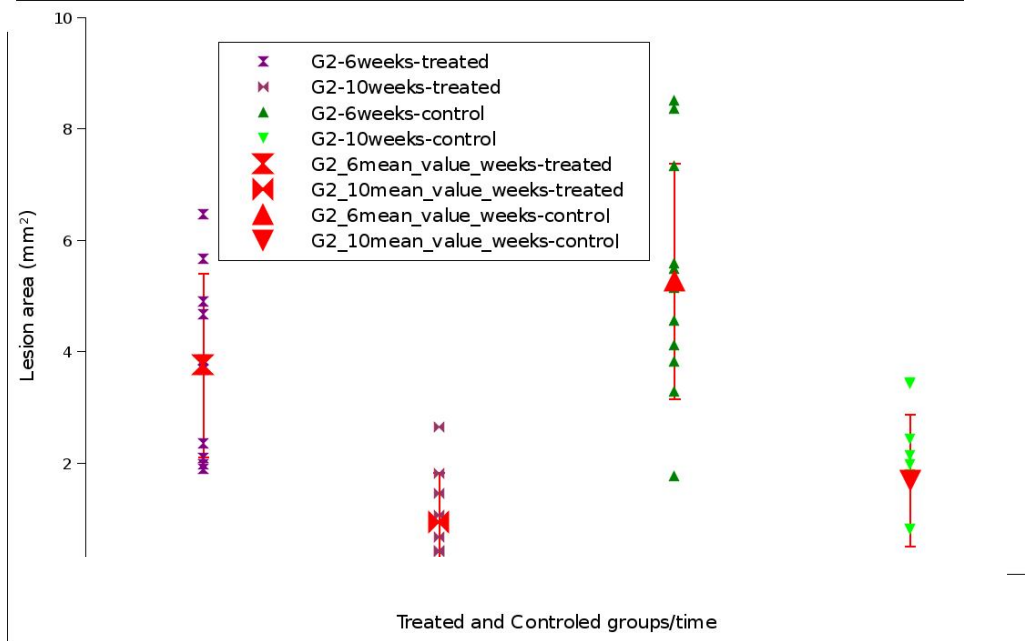


Figure 3 (b)

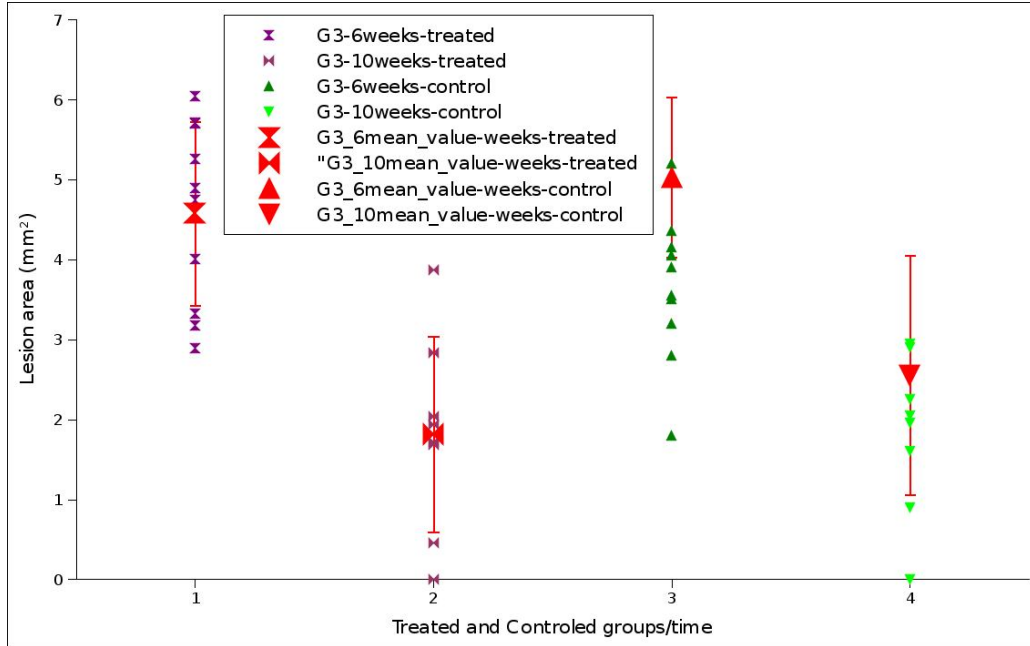


Figure 3 (c)

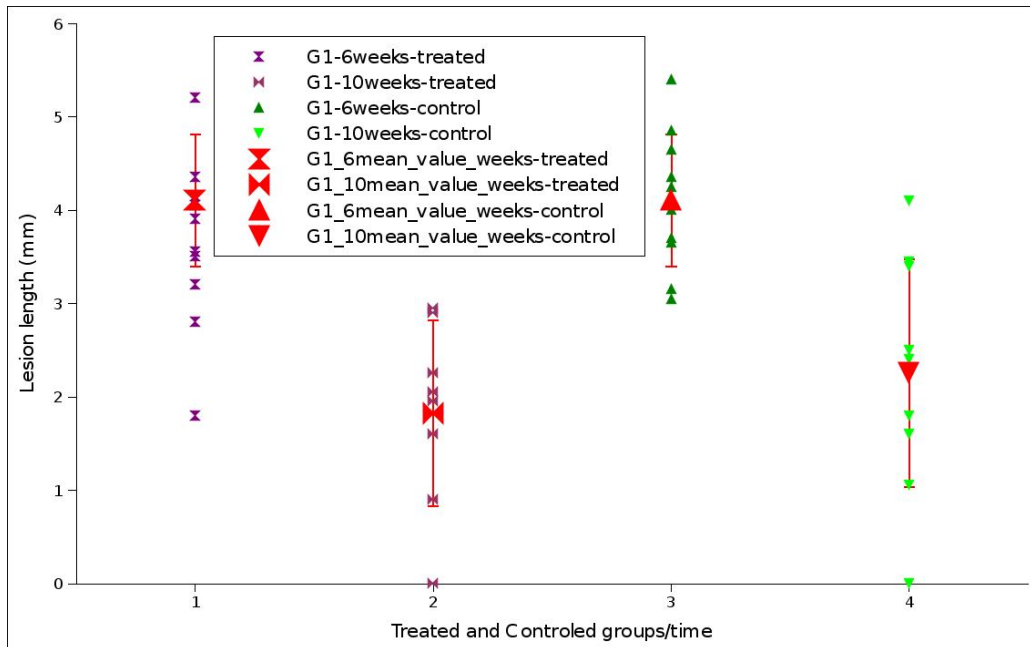


Figure 4: Charts of the evolution of lesion length to 6 and 10 weeks of control and treated groups and their mean values and standard deviations for (a) MC + TGFβ group, (b) and MC + PRP (c) MC + PRP + TGFβ.

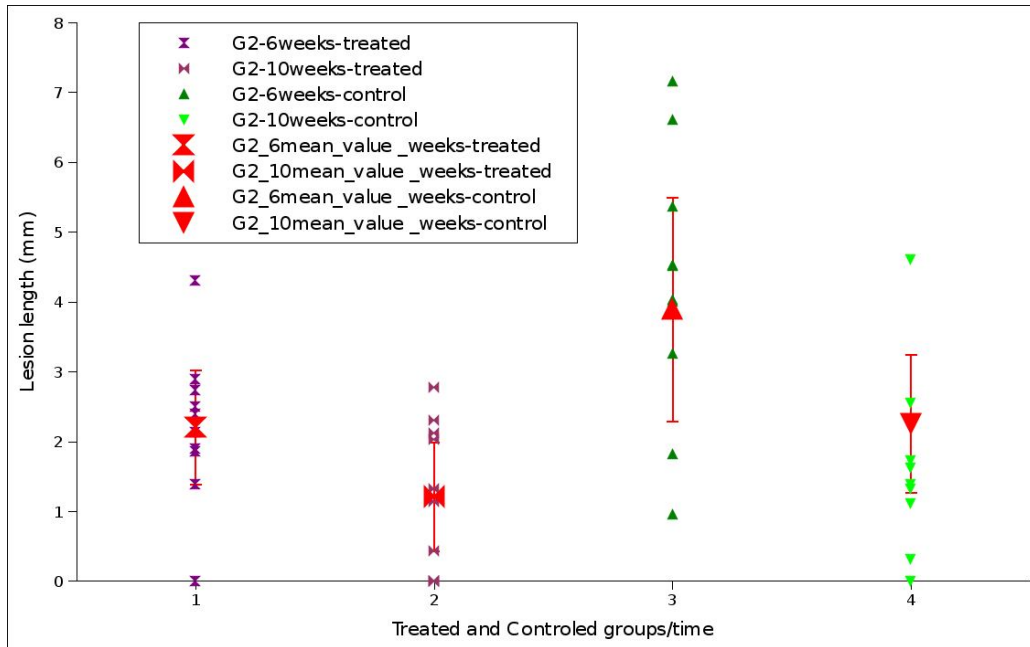


Figure 4 (b)

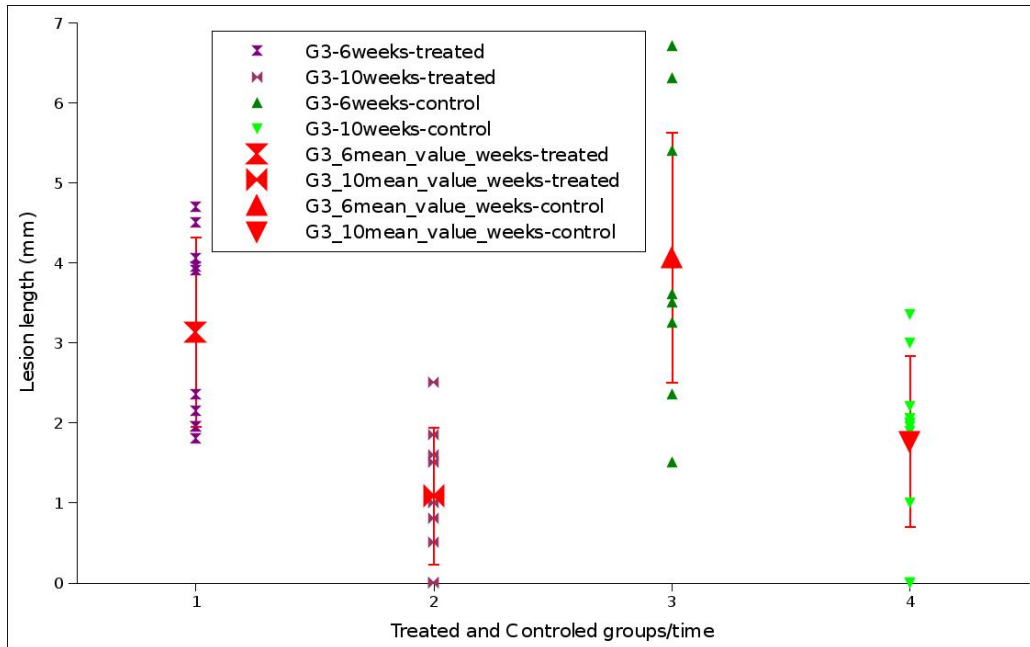


Figure 4 (c)

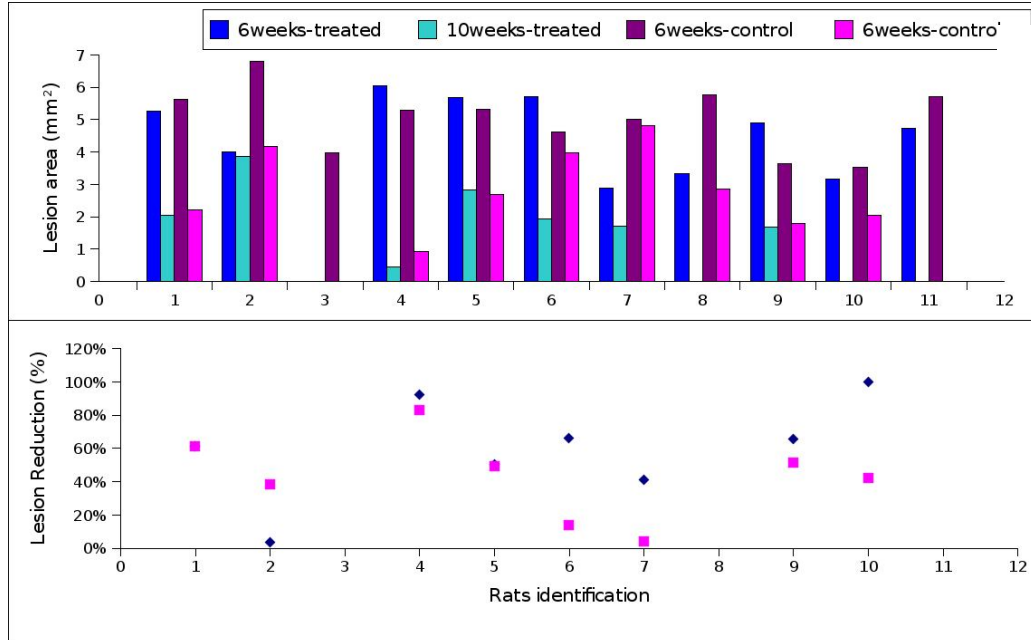


Figure 5: Charts of the lesion reduction rate in area at 6 and 10 weeks in groups (a) MC + TGF- β (b) MC + PRP (c) MC + PRP + TGF- β . The pink color indicates the Control group and the blue color indicates the group.

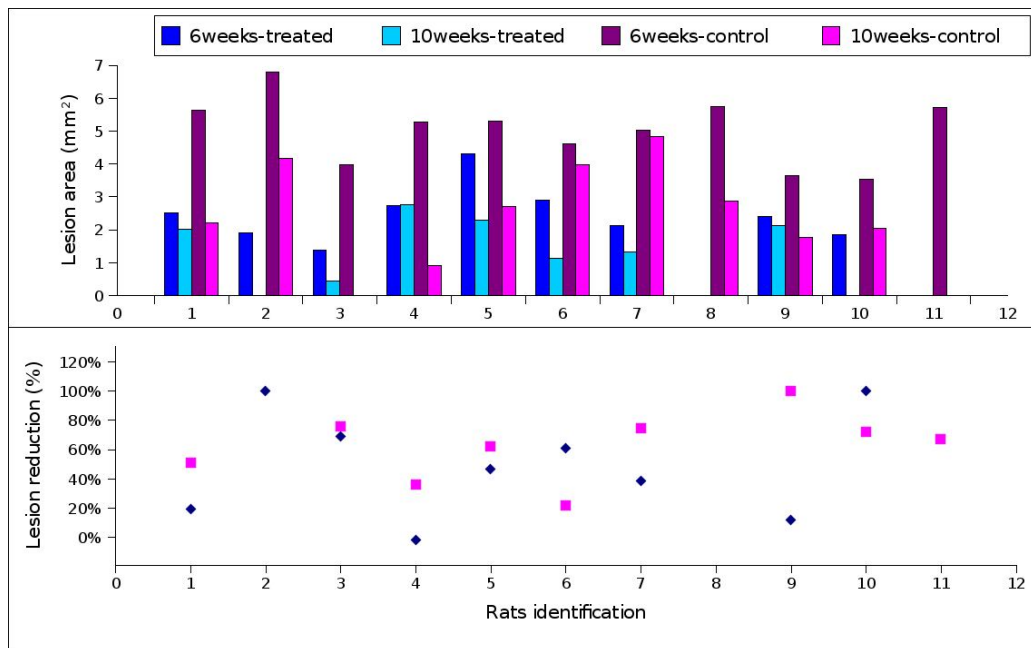


Figure 5 (b)

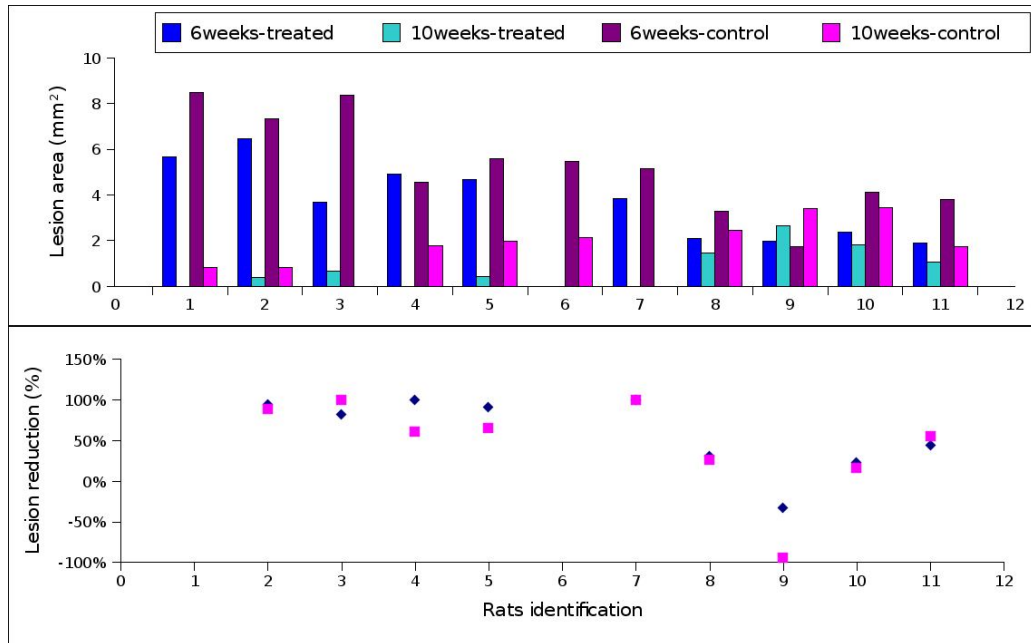


Figure 5 (c)

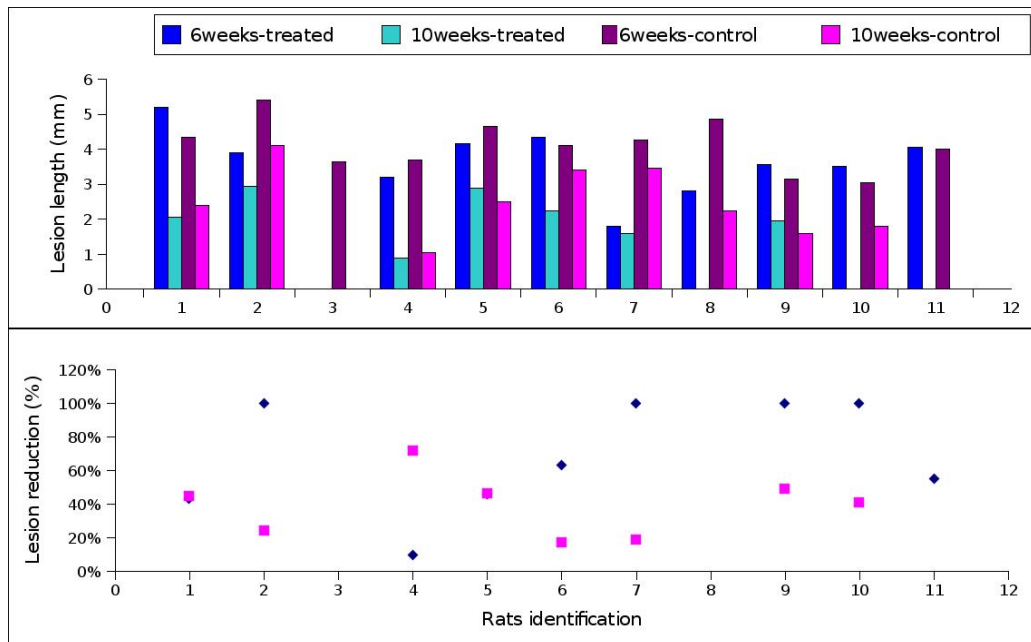


Figure 6: Charts of the length reduction rate at 6 and 10 weeks in groups (a) MC + TGF- β (b) MC + PRP (c) MC + PRP + TGF- β . The pink color indicates the Control group and the blue color indicates the group.

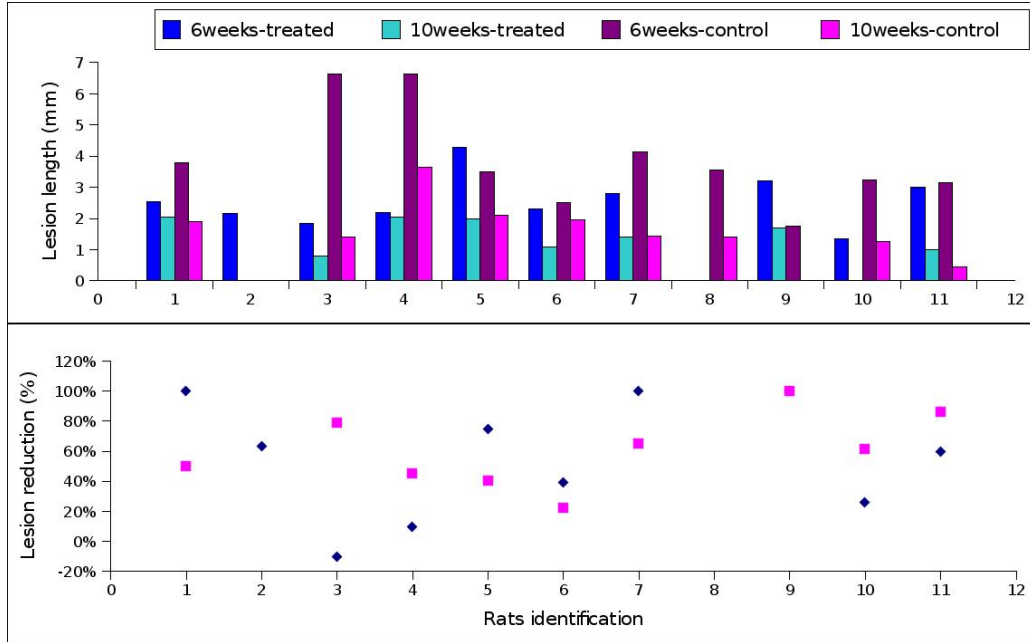


Figure 6 (b)

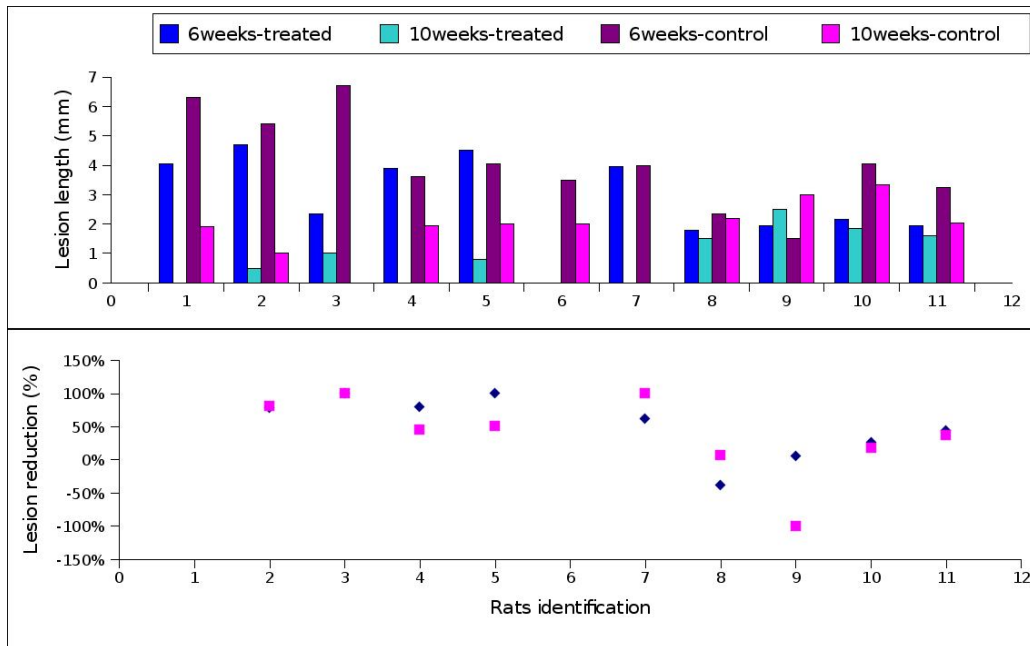


Figure 6 (c)

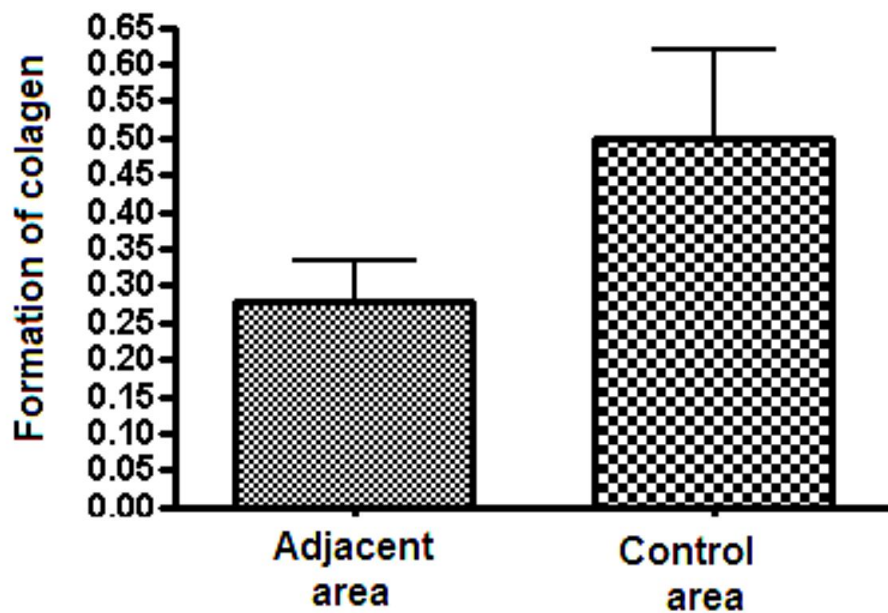


Figure 7: Bar graph of (a) Group MC + TGF- β - Adjacent area X Control Area $p = 0.172$; (b) Group MC + TGF- β - Adjacent area X Treated area $p = 0.967$; (c) Group MC + TGF- β - Treated Area X Control area $p = 0.228$; (d) MC + PRP Group - Adjacent area X Control Area $p=0.398$; (e) MC + PRP Group - Adjacent area X Treated area $p = 0.378$ (f) MC + PRP Group - Treated area X Control area $p = 0.296$.

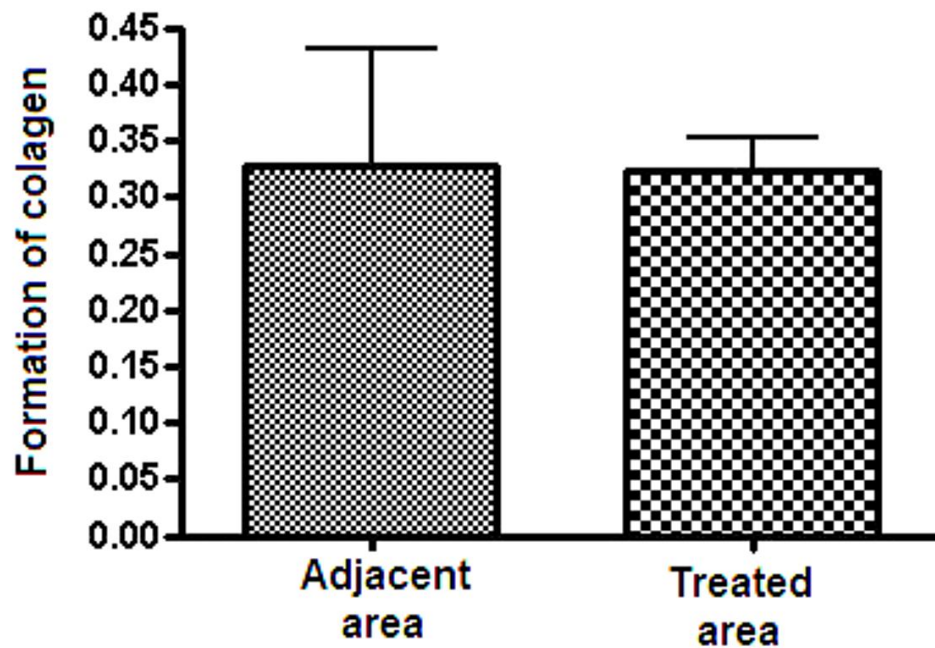


Figure 7 (b)

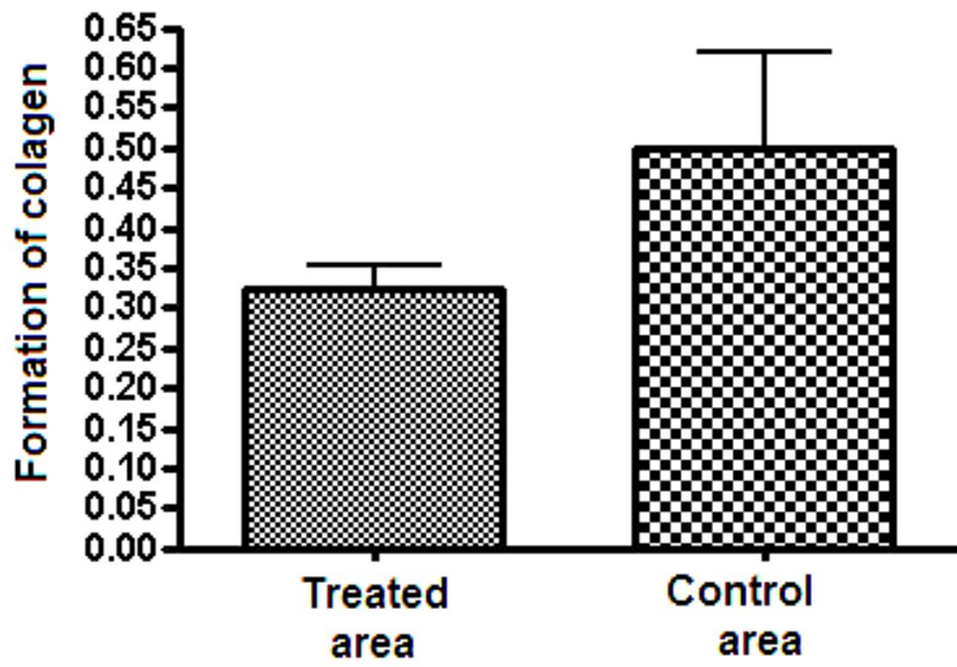


Figure 7 (c)

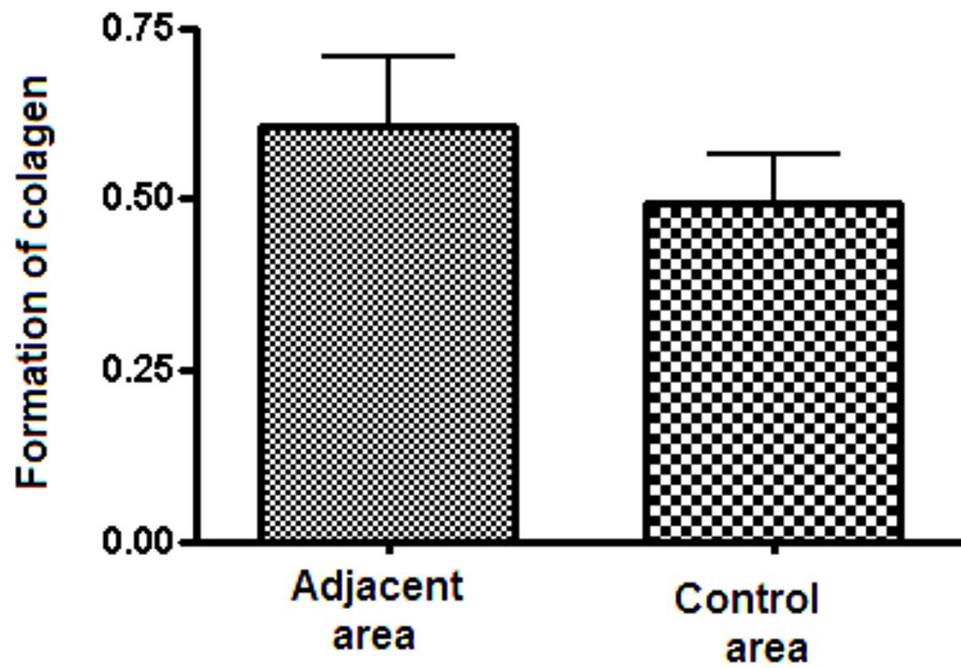


Figure 7 (d)

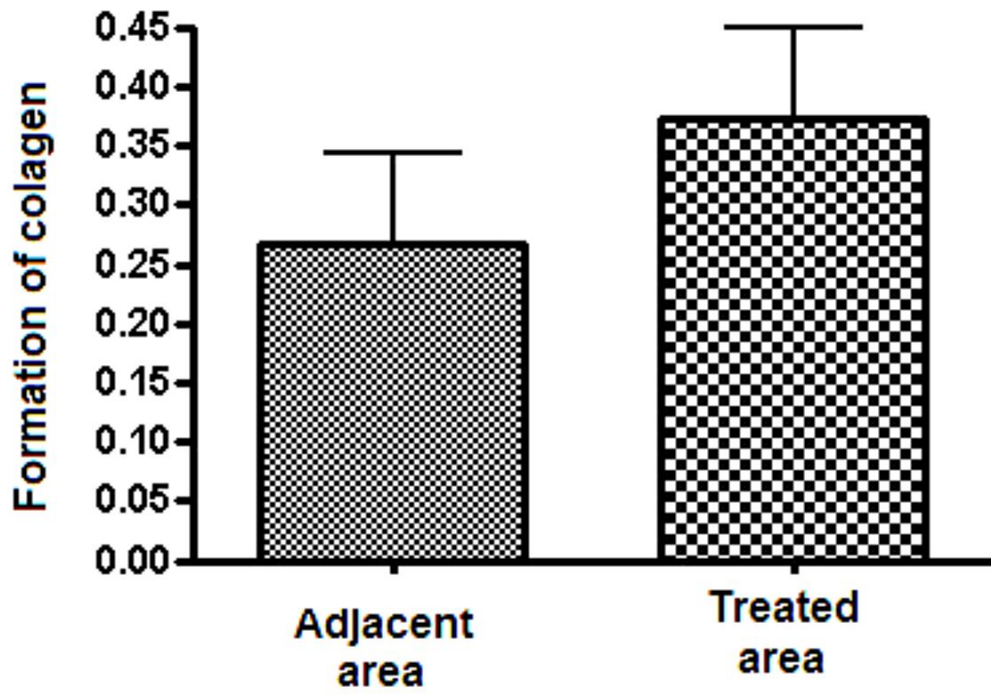


Figure 7 (e)

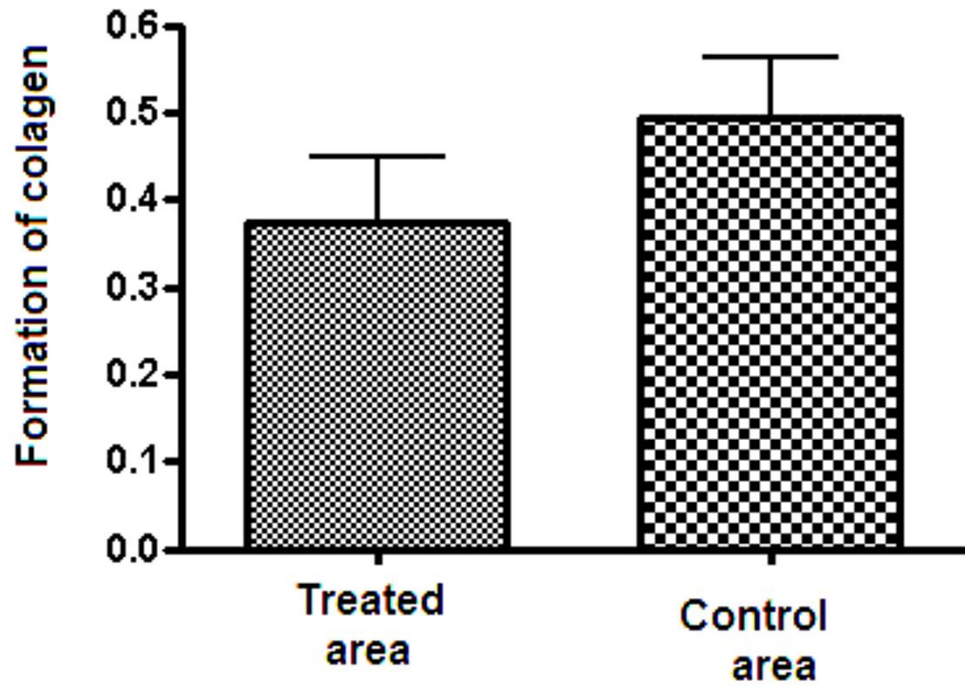


Figure 7 (f)

ANEXO F

Procedimento Operacional Padrão (POP) - Image J

.1 Abrir a imagem

No menu do Image J: *File* → *Open* (de acordo com a figura 1)



Figura 1: Abertura do Menu

Abrir a janela (ilustrada na Figura 2 que segue) selecione o arquivo .dcm de interesse.

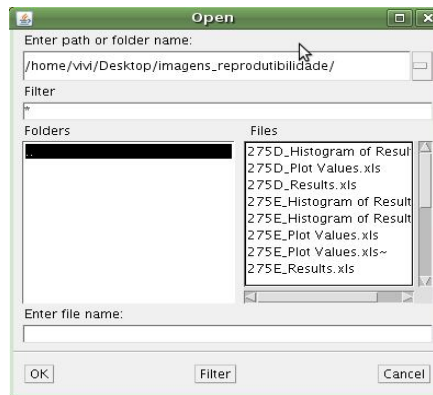


Figura 2: Aberturas dos Arquivos

A imagem abrirá conforme mostra a Figura 3 que segue selecione.



Figura 3: Imagem selecionada aberta

2 Selecionar a ferramenta *Rectangular selections* (Figura 4) a região de interesse. Selecione os dois fêmures completos do rato (Figura 5).

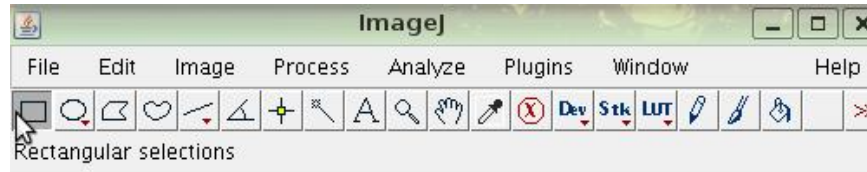


Figura 4: Ferramenta de Seleção Retangular

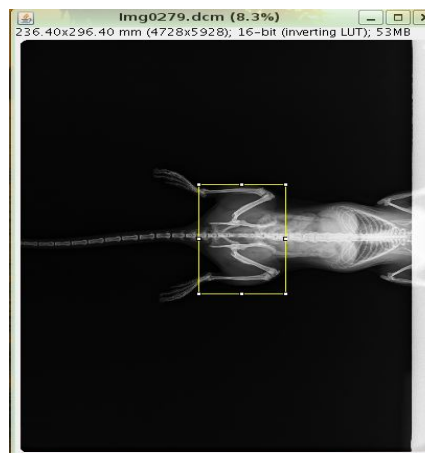


Figura 5: Imagem com Região Seleccionada

3. Após a seleção da área retangular, na barra de ferramentas faça: *Image* → *Crop*. A imagem será recortada para a área de interesse conforme mostra a Figura 6.



Figura 6: Corte Ampliado da Seleção Retangular

4 Usando a ferramenta *Straight line selections* (Figura 7), marque uma linha entre 19mm e 20mm a partir da cabeça do fêmur, conforme ilustra a Figura 8.



Figura 7: Seleção da Ferramenta



Figura 8: Usando a Ferramenta de Seleção *Straight Line*

5 Usando o final da linha como referência, marque com a ferramenta *Rectangular selections* (Figura 9) a nova região de interesse, que deve englobar a área referenciada anteriormente.



Figura 9: Área Referenciada Selecionada

6. Após a seleção da área retangular, na barra de ferramentas faça: *Image* → *Crop*. A imagem será recortada para a área de interesse, conforme mostra a Figura 10 a seguir.

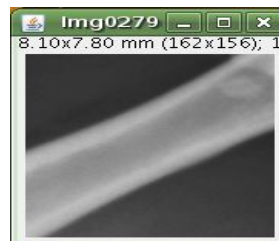


Figura 10: Imagem Recortada da Área de Interesse

7. Pode-se usar a ferramenta *Magnifying glass* para aumentar a imagem. A Figura 11 mostra a localização desta ferramenta.



Figura 11: Ferramenta para Ampliação da Imagem

8. Pode-se usar também a ferramenta *Image* → *Adjust* → *Brightness/Contrast* para adequar o brilho e o contraste da imagem para facilitar a visualização da lesão (Figura 12).

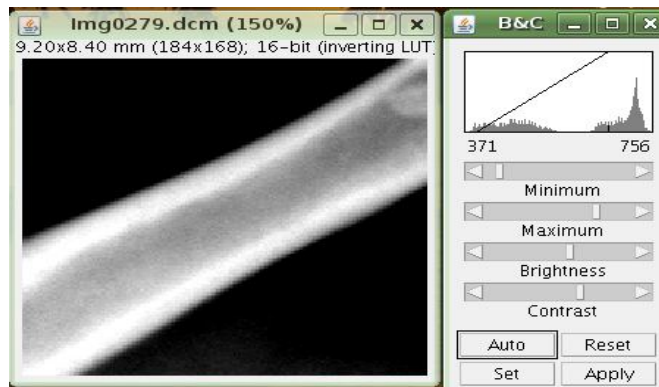


Imagem 12: Imagem ampliada com ajuste de brilho e contraste

9. Com a ferramenta *Freehands selections*, marque a região da lesão o mais próximo possível do contorno visualizável (Figura 13 e 14). A lesão pode ser uma marca clara ou suavemente mais escura que a região da medula, de formato oval.

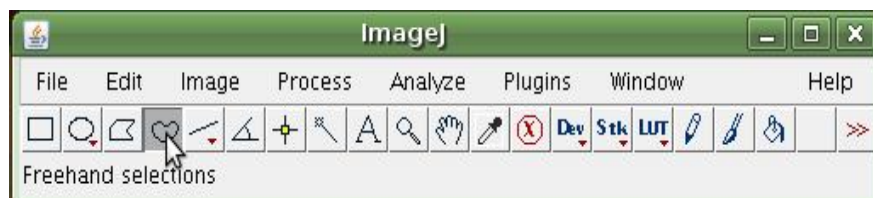


Figura 13: Ferramenta para Marcação Manual da Lesão

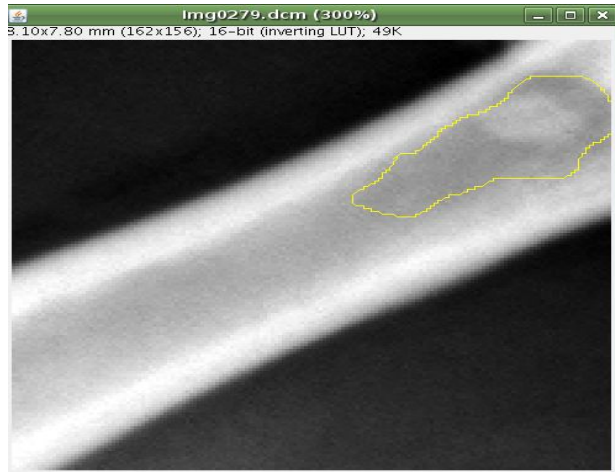


Figura 14: Imagem com Região Marcada Manualmente

10. Utilize a ferramenta Snake no caminho: *Plugins* → *ABSsnake* --> *ABSsnake*. Uma tela de comunicação com o usuário irá abrir, conforme mostra a Figura 15 que segue. Parâmetros: Após o estabelecimento dos parâmetros, tem-se uma imagem *ImgXXX.dcm_ABSsnake* como na Figura 16 e uma *ImgXXX.dcm_seg* (imagem segmentada) como na Figura 17.

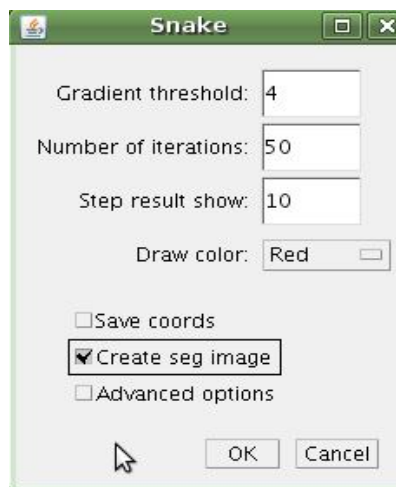


Figura 15: Parâmetros para a Formação da Máscara

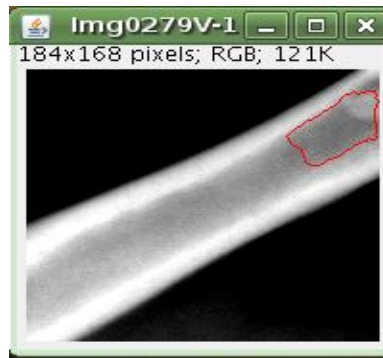


Figura 16: ImgXXX.dcm Absnake



Figura 17: Imag XXX.dcm_seg

11. Para as máscaras *ImgXXX.dcm_seg*¹ e *ImgXXX.dcm_ABsnake*¹ deve ocorrer a conversão para imagem de 16-bit. Para tanto marque uma imagem de cada vez e siga o caminho: *Image* → *Type* → *16-bit*. O resultado dessa conversão é observado na Figura 18, a seguir.

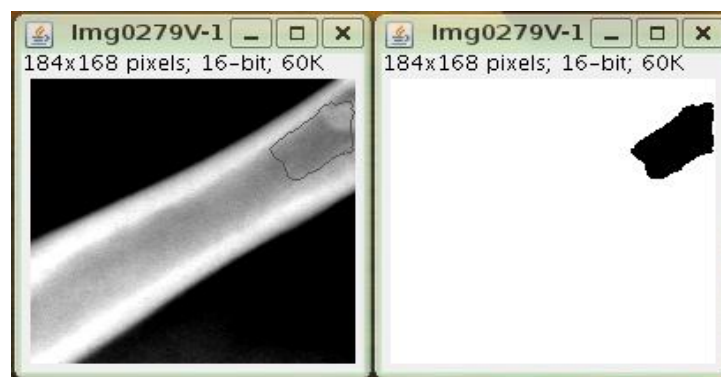


Figura 18: Imagens com 16 bits

12. Faça o processo de inversão da imagem *ImgXXX.dcm_seg* clicando na imagem e seguindo o caminho: *Edit* → *Invert*. Assim, a área de

interesse ficará com valor de intensidade de sinal 255 e fora será registrado o valor 0 (zero), ilustrado na Figura 19 abaixo.



Figura 19: Imagem Invertida

13. Para esta mesma imagem selecione o caminho Process → Math → Divide e na tela que abre coloque como divisor o valor 255 (Figura 20). A imagem segmentada será composta por uma região preta a outra cinza, conforme ilustra a Figura 21.

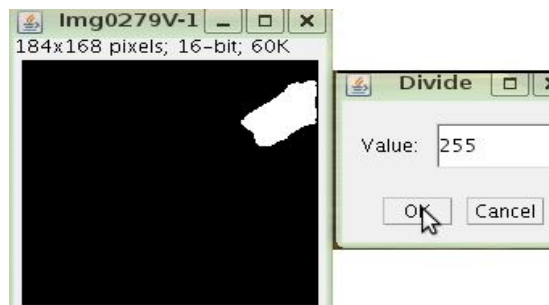


Figura 20: Imagem sendo dividida



Figura 21: Imagem resultado da Divisão

14. Multiplique a imagem segmentada (ImgXXX.dcm_seg) pela máscara do ABsnake (ImgXXX.dcm_ABsnake_) Figura 22 seguindo o processo: *Process* → *Image Calculator*. Preencha as opções conforme ilustra a Figura 23. Você terá como resultado uma imagem conforme ilustra a Figura 24. Esta imagem será utilizada para a definição da área e da dimensão do comprimento da área.

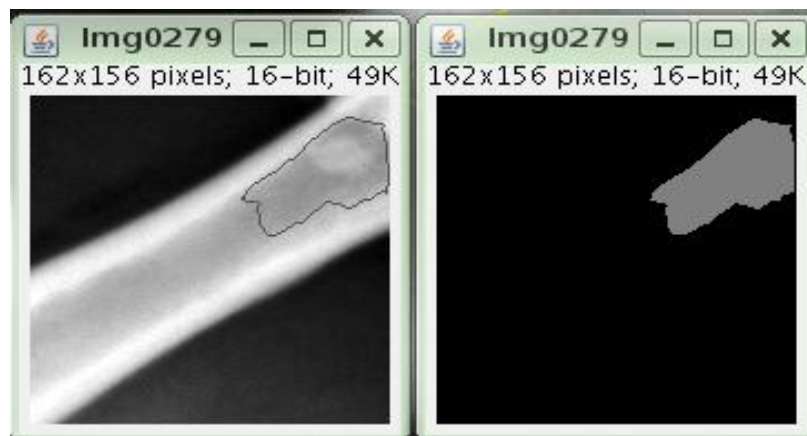


Figura 22: Imagens a serem Multiplicadas

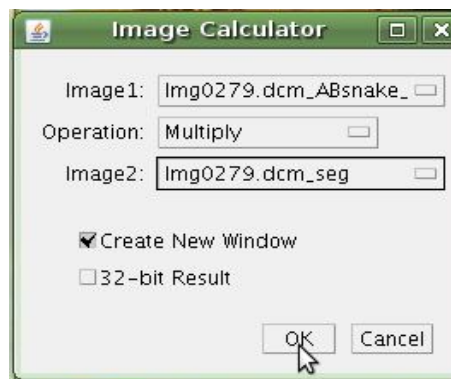


Figura 23: Opções a serem Preenchidas

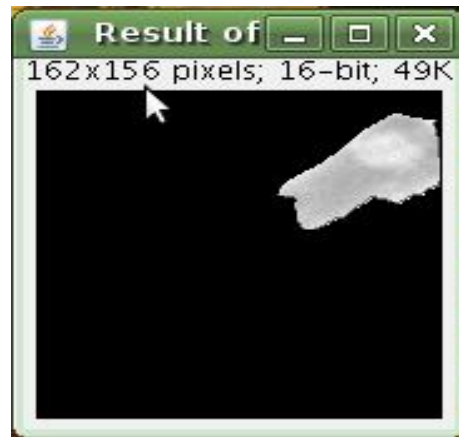


Figura 24: Imagem resultante da Multiplicação

15. Salve o resultado da imagem (Figura 24) utilizando o menu do programa ImageJ *File* → *Save* e, use somente a imagem resultado deste processo para montar o histograma com o seguinte caminho: *Analyse* → *Histogram* e teremos a Figura 25 que se segue.

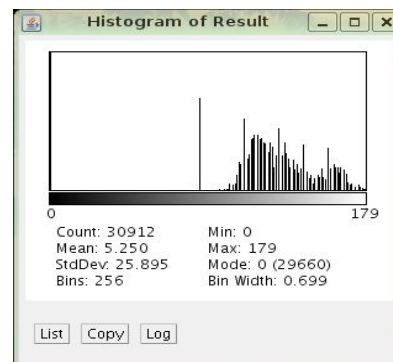
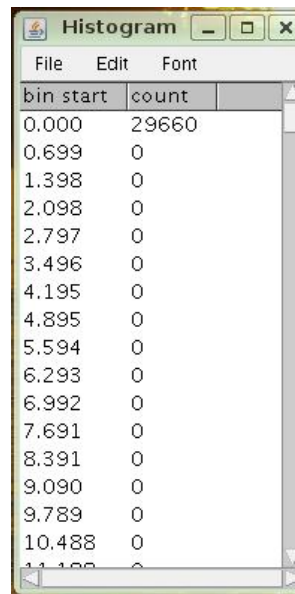


Figura 25: Histograma

16. Marcando em *List* obtemos a tabela mostrada na Figura 26, e que nos levará ao cálculo da área da região de interesse através de uma planilha de cálculo.



bin start	count
0.000	29660
0.699	0
1.398	0
2.098	0
2.797	0
3.496	0
4.195	0
4.895	0
5.594	0
6.293	0
6.992	0
7.691	0
8.391	0
9.090	0
9.789	0
10.488	0
11.188	0

Figura 26: Tabela com Valores para Cálculo da Área

17. Para salvar a tabela criada a partir do *Histogram*, Figura 26 siga o caminho: *File* → *Save as*, no menu da própria tabela e, abrirá a janela mostrada na Figura 27, complete o nome do arquivo com o número da imagem *_XXX* correspondente, ficando o arquivo *Histogram of Results _XXX* e marque em *Save*. Selecione o diretório com o seu nome para realizar o salvamento.

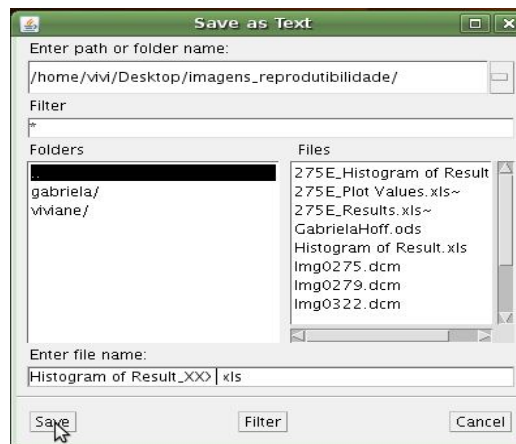


Figura 27: Arquivo salvo

18. Ainda usando a imagem resultado (Figura 24), obtém-se o cálculo do comprimento da área de interesse seguindo o caminho: Com a

ferramenta *Straight line selections* marca-se a área de interesse como ilustra a Figura 28.

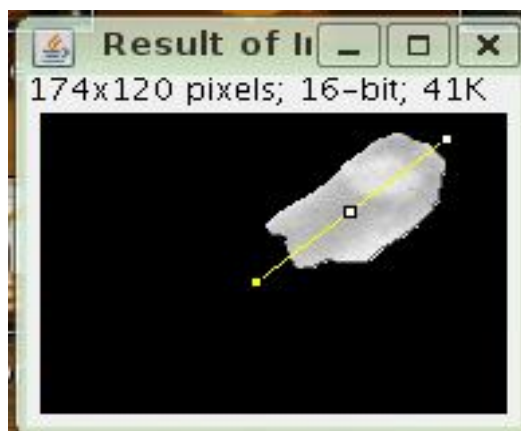


Figura 28: Imagem marcada com a ferramenta *Straight line selections*

Seguindo o caminho: *Analyse-->Plot Profile* e teremos a Figura 29 que segue

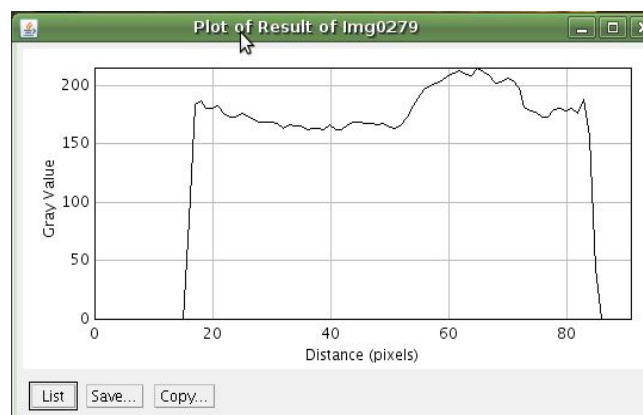
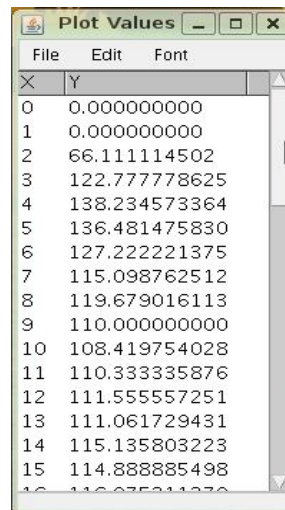


Figura 29: Gráfico Resultante

Marcando em *List* obtém-se novamente uma tabela (Figura 30 abaixo) que deve ser salva através dos procedimentos anteriormente descritos no ítem 17.



X	Y
0	0.000000000
1	0.000000000
2	66.111114502
3	122.777778625
4	138.234573364
5	136.481475830
6	127.222221375
7	115.098762512
8	119.679016113
9	110.000000000
10	108.419754028
11	110.333335876
12	111.555557251
13	111.061729431
14	115.135803223
15	114.888885498
16	116.075311270

Figura 30: Tabela com Valores para o Cálculo do Comprimento da Região

Esta tabela da Figura 30 fornece os valores necessários para o cálculo do comprimento da área de interesse.

19. Para o cálculo dos aspectos relevantes para a análise dos resultados e que são: Contraste, Sinal, Ruído e da Razão Sinal/Ruído que são obtidos através de uma tabela partindo da marcação de duas áreas na imagem original da região de interesse, uma dentro da lesão e a outra na medula óssea próxima a lesão usando programa ImageJ com a ferramenta *Elliptical*, como mostra nas Figuras 31, 32 e 33 que segue.

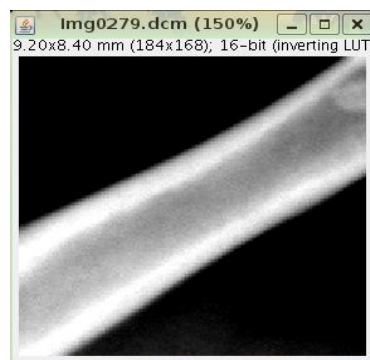


Figura 31: Imagem Original



Figura 32: Marcação de Região na Medula Óssea

20. A tabela com os resultados surge a partir do momento, que usando-se o programa ImageJ e, após a marcação de cada área, faz-se o caminho: *Analyse--> Measure*, mostrado na Figura 34. Salve os resultados dessa tabela realizado todos os procedimentos anteriormente descritos no item 8.17.

	Area	Mean	StdDev	Min	Max
1	0.815	579.285	10.171	553	604
2	0.815	535.755	13.732	494	567

Figura 33: Tabela com Valores para o Cálculo do Contraste, Sinal, Ruído e SNR

Dessa mesma forma, todas as **Listas de Dados** surgidas a partir de ***Histogram***, ***Plot Profile*** ou ***Mensure*** devem ser salvas para serem trabalhadas nas planilhas de cálculos.