

ANDRÉ ANTONIO PELEGRINE

**REPARO DE ALVÉOLOS DENTAIS COM O USO DO
ENXERTO DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGA**

Orientador: Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

2009

REPARO DE ALVÉOLOS DENTAIS COM O USO DO ENXERTO DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGA

Aluno: André Antonio Pelegrine

Orientador: Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior

Tese apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Clínica Médica, área de Ciências Básicas.

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

<p>P362r</p>	<p style="text-align: center;">Pelegrine, André Antonio</p> <p>Reparo de alvéolos dentais com o uso do enxerto de medula óssea autóloga / André Antonio Pelegrine. Campinas, SP : [s.n.], 2009.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : José Francisco Comenalli Marques Junior</p> <p style="text-align: center;">Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p>
--------------	---

Título em inglês : Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft

Keywords: • Tooth socket
• Bone marrow
• Osteogenesis

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Junior

Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula

Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno

Data da defesa: 18-12-2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Banca examinadora da tese de Doutorado

André Antonio Pelegrine

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior

Membros:

1. Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk

2. Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno

3. Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula

4. Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

5. Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/12/2009

DEDICATÓRIA

À minha esposa Renata, pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus pais, Rino e Dalva, que me forneceram os alicerces para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha filha Lara, que antes mesmo de nascer já ilumina nossos corações.

À todos familiares e verdadeiros amigos, pela satisfação de saber que tenho com quem contar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior, por me orientar e demonstrar como conciliar competência profissional, ética, visão crítica e altruísmo.

À Profa. Dra. Maria Elvira Pizzigatti Correa, pela supervisão e constantes conselhos em momentos decisivos.

Ao Hemocentro da UNICAMP, vinculado à pessoa do Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, pela oportunidade de me aprimorar.

À Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, por viabilizar meu desenvolvimento na carreira acadêmica e permitir a condução das análises histomorfométricas desta pesquisa, por meio da colaboração da Profa. Dra. Cristiane Furuse.

Aos pacientes voluntários deste estudo, pela confiança, coragem e ajuda no desenvolvimento da ciência.

Ao Roberto Zulli, pela ajuda nas avaliações estatísticas do estudo.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Às empresas IMPLAC e Laboratórios KIM, vinculados às pessoas dos Drs. Cláudio Chedid e Chang Kim, pelo patrocínio do estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Gomes Henriques, uma mescla de guru e amigo, incentivador e um dos grandes responsáveis pelo meu desenvolvimento profissional.

Ao colega Carlos Eduardo Sorgi da Costa, pela ajuda na condução da parte experimental do trabalho, pelo incentivo e pela amizade verdadeira.

A todos os médicos, funcionários e colegas do Hemocentro da UNICAMP, pela cooperação e paciência. Sem o apoio de toda uma equipe a concretização deste trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ESQUEMAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUÇÃO.....	17
1- Reparo de Alvéolos Dentais.....	18
2- Uso de Células Tronco Estromais em Reconstruções Ósseas.....	21
2.1- Uso do enxerto de medula óssea autóloga fresca (EMOAF) – <i>in natura</i>	24
2.2- Uso de concentrado de células da medula óssea autóloga (CCMOA) - por centrifugação	26
2.3- Uso de cultivo de células estromais da medula óssea autóloga (CCEMOA) - <i>ex vivo</i>	27
OBJETIVOS.....	30
PACIENTES E MÉTODOS.....	32
1- Pacientes.....	33
2- Protocolo cirúrgico.....	34
3- Avaliação da perda óssea.....	39

4- Preparação dos espécimes.....	40
5- Avaliação histomorfométrica.....	41
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	77
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	78
Anexo 2 – Parecer do comitê de ética em pesquisa da Universidade de Campinas – UNICAMP.....	79
Anexo 3 – Aceite do periódico <i>qualis A</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS

CCEMOA = cultivo de células estromais da medula óssea autóloga

CCMOA = concentrado de células da medula óssea autóloga

CT = células tronco

CTE = células tronco estromais

CTH = células tronco hematopoiéticas

CTM = células tronco mesenquimais

DP = desvio padrão

EMOAF = enxerto da medula óssea autóloga fresca

GC = grupo controle

GT = grupo teste

MCVE = mensuração clínica vertical externa

MCVI = mensuração clínica vertical interna

MCH = mensuração clínica horizontal

mm= milímetros

mg = miligrama

mL = mililitro

MO = medula óssea

POV = perda óssea vestibular

POP = perda óssea palatina

RTG = regeneração tecidual guiada

TM = tecido mineralizado

TNM = tecido não mineralizado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Cascata de diferenciação de células tronco medulares.....	21
FIGURA 2- Aspiração da medula óssea.....	33
FIGURAS 3 a,b- Remoção do dente (a) e rebatimento de um retalho de espessura total (b).....	34
FIGURAS 4 a, b, c, d- Fixação do parafuso(a); Mensuração clínica vertical externa(b); Mensuração clínica vertical interna(c); Mensuração clínica horizontal(d).....	35
FIGURAS 5 a, b, c- Medula óssea autóloga coletada(a); Preenchimento do alvéolo com medula óssea no grupo teste(b); Sutura(c).....	36
FIGURAS 6 a, b- Remoção do espécime com fresa trefina(a); Implante utilizado no estudo(b).....	37
FIGURAS 7 a, b, c, d- Vista histológica: Grupo teste HE-50x e HE-200x (a, b respectivamente) Grupo controle HE-50x e HE-200x (c, d respectivamente).....	37
FIGURAS 8 a, b- Perda óssea vestibular em sítios dos grupos controle(a) e teste(b). Notar o maior nível de reabsorção vestibular presente no GC.....	39
FIGURAS 9 a, b, c- Equipamento utilizado para avaliação histomorfométrica(a, b) Delineamento do tecido mineralizado para histomorfometria(c).....	40
FIGURAS 10 a, b- Instalação de pilar protético sobre implante(a) Cimentação de coroa provisória sobre pilar protético(b).....	48

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Medida clínica vertical externa (MCVE).....	38
ESQUEMA 2. Medida clínica vertical interna (MCVI).....	38
ESQUEMA 3. Medida clínica horizontal (MCH).....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes.....	32
TABELA 2. Comparação dos dados clínicos e demográficos entre os grupos.....	42
TABELA 3. Mensurações clínicas dos alvéolos antes e depois das extrações (em milímetros).....	42
TABELA 4. Variação dos parâmetros clínicos entre baseline e 6 meses (em milímetros) – comparação intragrupos.....	43
TABELA 5. Perda óssea em espessura (em porcentagem) – comparação intergrupos.....	45
TABELA 6. Perda óssea em espessura vestibular e palatina (em milímetros) – comparação intergrupos.....	46
TABELA 7. Posicionamento de implante com e sem procedimentos secundários de expansão e/ou enxertia óssea.....	48
TABELA 8. Análise histomorfométrica de tecido ósseo mineralizado (em porcentagem) – comparação intergrupos.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Perda MCVE versus Grupo.....	43
GRÁFICO 2. Ganho MCVI versus Grupo.....	44
GRÁFICO 3. Perda MCH versus Grupo.....	44
GRÁFICO 4. Perda óssea em espessura versus Grupo.....	45
GRÁFICO 5. POV versus Grupo.....	46
GRÁFICO 6. POP versus Grupo.....	47
GRÁFICO 7. Análise histomorfométrica versus Grupo.....	49

RESUMO

Objetivo: Avaliar o potencial do enxerto de medula óssea autóloga em se preservar o processo alveolar após a extração dental. **Pacientes e Métodos:** 13 pacientes com necessidade de extração de 2 a 4 dentes anteriores superiores, com um total de 30 dentes a serem extraídos, foram inseridos neste estudo. Eles foram randomizados em dois grupos: 7 pacientes com 15 dentes a serem extraídos no grupo teste e 6 pacientes com 15 dentes a serem extraídos no grupo controle. Foram coletados 5 ml de medula óssea do íliaco por hematologistas, imediatamente antes das cirurgias, nos pacientes do grupo teste. Após a extração dos dentes e rebatimento de um retalho de espessura total, foram fixados parafusos de titânio através da tábua óssea vestibular até a palatal os quais foram usados como pontos de referência para mensurações. Os alvéolos foram preenchidos com medula óssea nos sítios experimentais sendo que nada foi enxertado nos sítios do grupo controle. Após 6 meses os sítios foram novamente abertos e foram realizadas as mensurações das perdas ósseas em espessura e altura. Neste momento, previamente à instalação do implante, foram removidos espécimes ósseos os quais foram preparados para avaliações histológicas e histomorfométricas. **Resultados:** O grupo teste mostrou melhores resultados ($p < 0,05$) na preservação do rebordo alveolar em espessura, com $1,14 \pm 0,87$ mm (mediana 1 mm) de perda óssea, comparado com o grupo controle, que obteve $2,46 \pm 0,4$ mm (mediana 2,5 mm) de perda óssea. A perda em altura da tábua óssea vestibular também foi maior no grupo controle do que no grupo teste ($p < 0,05$), $1,17 \pm 0,26$ mm (mediana 1 mm) e $0,62 \pm 0,51$ (mediana 0,5 mm), respectivamente. Em cinco sítios do grupo controle foram necessários procedimentos de expansão ou enxertia óssea complementar para se instalar os implantes, enquanto em nenhum dos sítios do grupo teste isto foi necessário. A análise histomorfométrica mostrou quantidades similares de osso mineralizado nos grupos controle e teste ($p > 0,05$), $42,87 \pm 11,33\%$ (mediana 43,75%) e $45,47 \pm 7,21\%$ (mediana 45%) respectivamente. **Conclusão:** Estes achados sugerem que o enxerto de medula óssea autóloga pode contribuir para o reparo do osso alveolar após extração dental.

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to evaluate the potential of an autologous bone marrow graft in preserving the alveolar ridges following tooth extraction.

Materials: 13 patients requiring extractions of 2 to 4 upper anterior teeth, with 30 teeth to be extracted, were enrolled in this study. They were randomized into two groups: 7 patients with 15 teeth to be extracted in the test group and 6 patients with 15 teeth to be extracted in the control group. Hematologists collected 5 ml of bone marrow from the iliac crest of the patients in the test group immediately before the extractions. Following tooth extraction and elevation of a buccal full-thickness flap, titanium screws were positioned throughout the buccal to the palatal plate and were used as reference points for measuring purposes. The sockets were grafted with autologous bone marrow in the test sites and nothing was grafted in the control sites. After 6 months, the sites were re-opened and bone loss measurements for thickness and height were taken. Additionally, prior to implant placement, bone cores were harvested and prepared for histologic and histomorphometric evaluation.

Results: The test group showed better results ($p < 0.05$) in preserving alveolar ridges for thickness, with 1.14 ± 0.87 mm (median 1) of bone loss, compared with the control group, which had 2.46 ± 0.4 mm (median 2.5) of bone loss. The height of bone loss on the buccal plate was also greater in the control group than in the test group ($p < 0.05$), 1.17 ± 0.26 mm (median 1) and 0.62 ± 0.51 (median 0.5), respectively. In five locations in the control group expansion or bone grafting complementary procedures were required to install implants, while these procedures were not required for any of the locations in the test group. The histomorphometric analysis showed similar amounts of mineralized bone in both the control and test groups ($p > 0.05$), $42.87 \pm 11.33\%$ (median 43.75%) and $45.47 \pm 7.21\%$ (median 45%) respectively.

Conclusion: These findings suggest that the autologous bone marrow graft can contribute to alveolar bone repair after tooth extraction.

INTRODUÇÃO

1- Reparo de Alvéolos Dentais

A despeito dos grandes avanços científicos alcançados na Odontologia e tecnologias aplicadas, muitas terapias atuais ainda não repercutem no retorno das estruturas orais aos seus aspectos normais de saúde. O osso alveolar cresce em resposta ao desenvolvimento dental e, uma vez removido o elemento dental, instaura-se um processo fisiológico de reabsorção e remodelação óssea. Portanto, a altura e espessura do osso alveolar são mantidas graças à permanência das raízes dentais dentro de seus alvéolos e a reabsorção do osso alveolar é um achado comum após a exodontia (Tallgren, 1972). Isto colabora para a criação de um problema estético frente à reabilitação e, em algumas situações, impede a instalação de implantes dentários (Mecall & Rosenfeld, 1996; Seibert & Lindhe, 1999). Nestes casos, a colocação do implante pode resultar em deiscência óssea, fato que possivelmente causará a perda da estabilidade primária do mesmo (Misch, 1996).

A cicatrização de um alvéolo dental inclui uma série de eventos que passa pela formação de um coágulo, sua substituição por um tecido de granulação e, posteriormente, preenchimento por trabeculado ósseo (Amler, 1969). Araújo & Lindhe (2005) demonstraram que durante este processo cicatricial as paredes do alvéolo são reabsorvidas e gradualmente remodeladas, especialmente a parede óssea vestibular a qual apresenta marcante reabsorção osteoclástica. A maior parte desta perda ocorre entre os primeiros meses da exodontia (Carlsson & Persson, 1967). Segundo Schropp et al (2003), isto resulta em uma perda em espessura de aproximadamente 50% após 10 meses da extração dental. Este fato torna necessária a indicação de cirurgias ósseas regenerativas previamente à instalação de implantes. Como, na maioria dos casos de enxertia, um período

cicatricial de 6 a 12 meses é necessário para – em um segundo momento cirúrgico – poder se instalar os implantes, existe uma inevitável repercussão no aumento da morbidade, custo e de tempo de tratamento. Portanto, uma abordagem racional quando da realização de uma exodontia seria a preservação do processo alveolar.

Basicamente duas técnicas vêm sendo sugeridas para se tentar prevenir o processo de reabsorção da tábua óssea vestibular alveolar. Uma delas preconiza a instalação de implantes imediatos (Paolantonio et al, 2001; Jovanovic & Buser, 1994; Warrer et al, 1991) e a outra o uso de técnicas regenerativas imediatamente depois da extração (Lekovic et al, 1998; Becker et al, 1998; Smukler et al, 1999; Camargo et al, 2000; Froum et al, 2002; Fiorellini et al, 2005; Fickl et al, 2008).

O trabalho de Lekovic et al (1998) demonstrou a viabilidade de se minimizar a perda óssea alveolar pós extração de dentes anteriores com o uso da técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) em humanos, onde uma membrana reabsorvível foi posicionada sobre os alvéolos frescos imediatamente antes da sutura. Por meio desta técnica foram conquistados menores níveis de perda óssea, especialmente em espessura, quando comparado ao grupo controle. Os autores observaram que os sítios controles perderam em média 3,43 mm a mais do que os experimentais. Segundo eles, uma preocupação constante ao se trabalhar com RTG é a possibilidade de exposição das membranas e conseqüente contaminação da área o que repercute na redução do volume e qualidade do osso.

Outros autores que utilizaram enxertos ósseos substitutos do osso autógeno para preservação das dimensões do rebordo após exodontia observaram, histologicamente, apesar dos benefícios clínicos, níveis de partículas

residuais dos materiais de enxertia não vitais, mesmo após períodos superiores a 6 meses (Smukler et al, 1999; Froum et al, 2002; Brkovic et al, 2008). Além disso, vem sendo verificada alguma atividade inflamatória com o uso dos biomateriais de enxertia comumente utilizados (Marei et al, 2005; Kok et al, 2005). Segundo Araújo et al (2009), a utilização de enxerto ósseo bovino Bio-Oss Collagen® em alvéolos frescos nitidamente retardou a cicatrização em cachorros, apesar de ter minimizado alterações dimensionais do ponto de vista clínico. Estes mesmos autores afirmaram que o uso do material de enxertia não incrementou o nível de neoformação óssea.

Apesar de alguns estudos sugerirem a instalação de implantes imediatamente após as extrações como técnica passível de se prevenir a perda em espessura e altura do rebordo alveolar, Araújo et al (2006) demonstraram um nível de evidência científica sobre a continuidade do processo de reabsorção óssea alveolar após instalação de implantes.

Portanto, a despeito do número de técnicas disponíveis e de trabalhos científicos publicados sobre o assunto, ainda não existe um consenso sobre qual a melhor técnica para se preservar as dimensões e qualidade óssea dos alvéolos dentais.

Um estudo recente demonstrou por meio de anticorpos monoclonais que, após a exodontia, células osteoprogenitoras do ligamento periodontal residual e da medula óssea contribuem para a regeneração óssea após a extração (Devlin & Sloan, 2002). Martin et al (2001) e Fiorellini et al (2005) verificaram que a cicatrização em alvéolos de ratos é acelerada pelo uso da proteína óssea morfogenética-2 recombinante. Os autores especularam que este fator de crescimento deve estimular a proliferação e diferenciação de células

mesenquimais no alvéolo de ratos preservando-se o volume ósseo cortical do mesmo. Marei et al (2005) e Kok et al (2005) estudaram o emprego de células indiferenciadas derivadas da medula óssea, cultivadas e aderidas a um substrato, em alvéolos frescos em modelos animais e verificaram resultados promissores nesta linha de pesquisa.

Achados como estes vêm incentivando pesquisadores a testarem cada vez mais grupos celulares e fatores de crescimento que poderiam maximizar os resultados regenerativos em alvéolos.

2- Uso de Células Tronco Estromais em Reconstruções Ósseas

A medula óssea (MO) é reconhecida por apresentar dois tipos de células tronco (CT): as hematopoiéticas e as estromais (Kotobuki et al, 2004). As células tronco hematopoiéticas (CTH) são responsáveis pela renovação dos elementos sanguíneos circulantes. Células tronco estromais (CTE), também chamadas de células tronco mesenquimais (CTM), são conhecidas desde 1968, por meio do trabalho de Friedenstein e colaboradores, mas o primeiro indício de que a medula pode formar osso remonta a mais de cem anos (Goujon, 1869). Teoricamente, como o próprio nome sugere, as células tronco mesenquimais têm o potencial de se diferenciarem em diferentes linhagens relacionadas aos tecidos mesenquimais.

Por definição, CT são capazes de se renovarem por si só e de se diferenciarem em pelo menos um tipo celular maduro. Enquanto as CT embrionárias são derivadas de embriões mamíferos no estágio de blastocisto e têm a habilidade de originar qualquer célula diferenciada do corpo, as CT maduras são intrínsecas aos tecidos de organismos pós natais e responsáveis pela

reposição celular no seu tecido específico como consequência do turnover celular fisiológico ou dano tecidual causado por injúria (Slack, 2000). Devido às controvérsias éticas sobre o uso das CT embrionárias, a maioria das pesquisas vêm focando sobre o uso de CT adultas que, teoricamente, não são tão versáteis quanto às embrionárias. No entanto, recentes estudos demonstraram a plasticidade de CT adultas, o que contradiz o dogma de que a diferenciação delas são restritas ao seu próprio tecido (Jiang et al, 2002; Herzog & Krause, 2003). Segundo Kotobuki et al (2004), CTE podem ser multipotenciais relacionadas à diferenciação em uma variedade de tipos celulares, como osteócitos, condrócitos, miócitos, células endoteliais, neurônios, hepatócitos, etc (Figura 1).

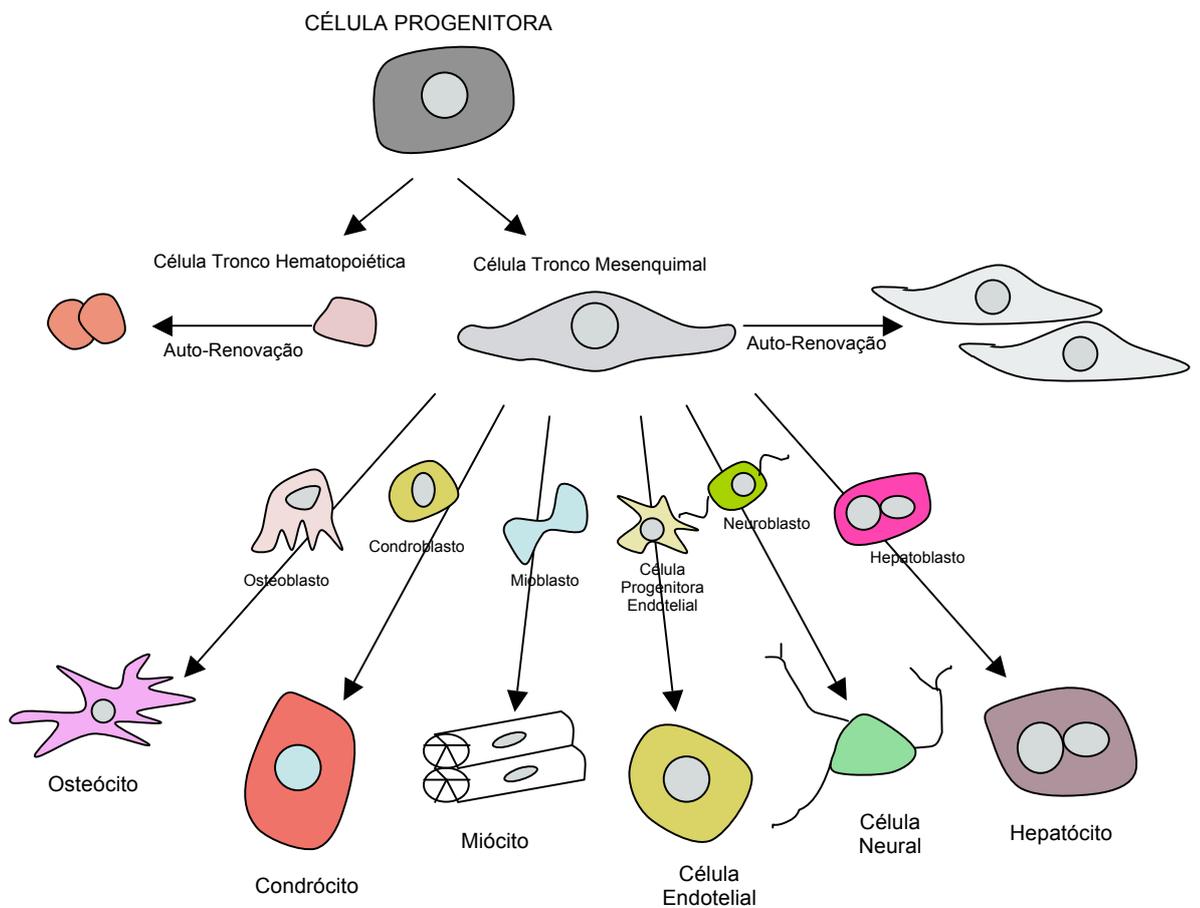


FIGURA 1- Cascata de diferenciação de células tronco medulares *

* (ADAPTADO DE KOTOBUKI ET AL, 2004)

Portanto, as CTE podem se diferenciar em uma variedade de células mesodérmicas, mas também em células ectodérmicas e endodérmicas. Partindo-se deste princípio a terminologia “mesenquimal”, para estas CT, pode representar um equívoco e, portanto, uma terminologia que seja embasada somente na origem da célula, como o termo “estromal”, possa prevenir polêmicas. Embasado nisso, foi dada preferência à terminologia “célula tronco estromal” (CTE) ao invés de “célula tronco mesenquimal” (CTM) nesta dissertação.

No entanto, a plasticidade das CT adultas e suas funções em órgãos sólidos específicos ainda continuam a ser motivo de grande controvérsia no meio científico (Korbling & Estrov, 2003). Segundo Lemoli et al (2005), que realizaram uma extensa revisão da literatura sobre a plasticidade de CT, as CTE da medula podem dar origem a tecidos de origem mesodérmica (osso, cartilagem, músculo, estroma medular, tendão, gordura e uma variedade de outros tecidos conjuntivos) mas alguns estudos têm demonstrado que o fenômeno de plasticidade (com potencial de originar tecidos de origem endodérmica e ectodérmica) é raro e a sua frequência não pode ser considerada, na atualidade, terapeuticamente relevante.

Segundo Gurevitch et al (2003) as células da MO constituem uma população celular heterogênea que apresentam potencial de se diferenciarem em outras que poderão formar os progenitores hematopoiéticos e mesenquimais, dependendo do microambiente da região receptora. Portanto, além de poder originar células sanguíneas, a medula óssea tem o potencial de promover células indiferenciadas (células tronco adultas) capazes de originar outros tecidos, dentre eles, o tecido ósseo e a cartilagem (Schliephake et al, 2001). Smiler et al (2008) demonstraram, por meio de anticorpos monoclonais específicos, que a MO contém significativamente mais CT osteogênicas do que o sangue periférico.

Segundo Yamamoto et al (2002), os osteoblastos (células produtoras de osso) são originários das células mesenquimais osteoprogenitoras localizadas dentro do tecido esquelético. A linhagem de células ósseas originadas de células mesenquimais indiferenciadas comprometidas com a osteogênese transforma-se em células osteoprogenitoras, pré osteoblastos, osteoblastos e osteócitos (Kale & Long, 2000) e, portanto, apresenta um grande potencial para formação óssea. As CT da medula óssea mostram também potencial angiogênico, pois secretam VEGF (*vascular endothelial growth factor*) quando transplantadas (Kaigler et al, 2003), o que favorece a integração de enxertos ósseos (Lucarelli et al, 2005).

Basicamente, a possibilidade de se empregar clinicamente estas células em procedimentos de regeneração óssea em humanos se dá, na atualidade, por três diferentes formas:

- (a) Uso do enxerto de medula óssea autóloga fresca (*in natura*);
- (b) Uso de concentrado de células da medula óssea autóloga (por centrifugação);
- (c) Uso de cultivo de células estromais da medula óssea autóloga (*ex vivo*).

2.1- Uso do enxerto de medula óssea autóloga fresca (EMOAF) - *in natura*

A obtenção de um enxerto de medula óssea fresca (EMOAF) é proveniente de uma aspiração de dentro da cavidade medular de ossos. Tradicionalmente, a medula óssea é aspirada do esterno ou ilíaco (Smiler & Soltan, 2006). Sabe-se que o potencial osteogênico da MO é reduzido em indivíduos idosos mais pela diminuição da quantidade de células osteoprogenitoras do que pela atividade das células remanescentes (Muschler et al, 2001). Sabe-se também que o potencial osteogênico da MO pode ser atenuado pela diluição com sangue periférico

durante a aspiração de grandes volumes (Muschler et al, 1997).

O EMOAF, como potencial indutor de regeneração óssea, foi avaliado em pesquisas em modelos animais, com uso em diferentes defeitos ósseos. Paley et al (1986), Tiedeman et al (1991) e Sharma et al (1992) relataram resultados promissores com uso de EMOAF na cicatrização de defeitos segmentais em animais. Lo et al (1995) também obtiveram bons resultados em coelhos, os quais foram maximizados pelo uso de hormônio do crescimento. O uso do EMOAF também demonstrou bons níveis de formação óssea em defeitos ósseos mandibulares (Krymanski et al, 1996) e quando utilizado concomitantemente ao procedimento de distração osteogênica na tíbia de coelhos (Hamanishi et al, 1994).

Estudos clínicos em humanos no fechamento de fendas palatinas (Jackson et al, 1981; Takahashi, 1999), fraturas (Connoly, 1998; Quarto et al, 2001) e reconstruções ósseas alveolares (Smiler & Soltan, 2006; Smiler et al, 2007; Soltan et al, 2007) corroboram os resultados destes experimentos em animais, demonstrando alto potencial regenerativo do EMOAF.

No entanto, alguns trabalhos contradizem os resultados de eficácia do EMOAF em se promover cicatrização de defeitos segmentais (Gebhart, M & Lane, 1991; Lane et al, 1999; Takagi & Urist, 1982). Block (2005) especula que, talvez pela consistência fluida da MO, seja difícil sua manutenção no sítio do defeito por um período de tempo adequado à osteogênese. Segundo o autor, a característica fluida também, em algumas situações, poderia limitar a possibilidade de promoção de uma estabilidade mecânica do defeito.

Entretanto, parece existir um consenso sobre os benefícios de se associar o enxerto de MO com biomateriais de enxertia osseocondutores, fazendo com que

os resultados da associação sejam superiores aos dos biomateriais usados sozinhos. Isto foi verificado associando-se o EMOAF com osso alógeno desmineralizado (Gebhart & Lane, 1991; Tiedeman et al, 1991), osso xenógeno (Plenk Jr et al, 1972; Gupta et al, 1982) e materiais cerâmicos (Ohgushi et al, 1989; Wolff et al, 1994; Grundel et al, 1991). Este efeito sinérgico provavelmente se deve à característica de arcabouço do biomaterial aliado à propriedade osteogênica da medula.

O EMOAF é o método de obtenção de CTE mais utilizado. Isto se deve ao fato da técnica não envolver grandes custos e ser considerada um procedimento minimamente invasivo (Lucarelli et al, 2004).

2.2- Uso de concentrado de células da medula óssea autóloga (CCMOA) - por centrifugação

Apesar da reconhecida presença de células osteoprogenitoras na MO adulta o seu percentual é pequeno (<1%) (Muschler & Midura, 2002). Como é estimado que existem por volta de apenas 32 milhões de células nucleadas por ml de medula, e somente uma em cada 18000 células nucleadas é uma CTE (Muschler et al, 2001), pode-se concluir que existem somente poucos milhares de CTE no EMOAF. Incrementar a quantidade de medula aspirada não representa uma solução já que em aspirações de grandes volumes muito sangue é aspirado ao invés de MO (Muschler et al, 1997). Portanto, especula-se que em defeitos ósseos ditos críticos, como em não uniões em tíbia e fusões espinhais, seja necessário um grande número de células osteoprogenitoras de forma a se mimetizar de maneira consistente o potencial de formação óssea do enxerto ósseo autógeno (Block, 2005).

Uma teoria plausível para se incrementar o potencial osteogênico do EMOAF é o da centrifugação e conseqüente concentração das células de maior potencial. Connolly et al (1989), usando uma simples centrifugação de células da medula óssea, verificou uma maior resposta osteogênica após implantação ectópica em coelhos dos implantes de concentrado celular quando comparado à medula óssea fresca.

Vadalà et al (2008) por meio de um processo de concentração de CT obtiveram um percentual de 5,46% de células CD34+/CD45+ e de 0,91% de células CD34-/CD90+, analisadas por citometria de fluxo em humano. Os autores preconizaram, após aspiração de MO autóloga, um processo de dupla centrifugação para se separar células vermelhas das mononucleares, as quais foram suspendidas em plasma. O *buffy coat* obtido por este processo simples contém todas as células mononucleares assim como plaquetas e outros fatores solúveis que têm papel na osteogênese. Esta técnica possibilita a concentração de células da MO de maneira rápida, na própria sala de operação antes do início da cirurgia e, apesar de requerer um custo e instrumentação extra, é considerada vantajosa à cultura celular, por razões de segurança, já que as células são quase que imediatamente reintroduzidas no sítio do defeito ósseo (Lucarelli et al, 2004).

2.3- Uso de cultivo de células estromais da medula óssea autóloga (CCEMOA) - *ex vivo*

Embasados no conhecimento de que células osteoprogenitoras derivadas da MO podem sofrer extensa replicação *in vitro* sem perder o potencial osteogênico (Bruder et al, 1997), vários estudos utilizaram a cultura de células expandidas para induzir a formação óssea (Kotobuki et al, 2004; Giannoni et al,

2008; Chen et al, 2007; Torigoe et al, 2009; Cerruti Filho et al, 2007; Gurevitch et al, 2003; Schliephake et al, 2001; Shayesteh et al, 2008; Yamada et al, 2008; Geiger et al, 2007; Doi et al, 2007; Kon et al, 2000; Cicconetti et al, 2007; Qi et al, 2006; Dégano et al, 2007; Kasten et al, 2006; Hasegawa et al, 2006; Lucarelli et al, 2005; Kotobuki et al, 2005; Yamada et al, 2004; Pieri et al, 2009). O cultivo destas células ganha ainda maior impacto se levarmos em consideração as estimativas de proporção CTE/célula nucleada de 1/18000 na MO (Muschler et al, 2001) e que, em ótimas condições de cultura, bilhões de CT da medula podem ser geradas a partir de uma pequena quantidade de material esquelético (Krebsbach & Robey, 2002).

Kawaguchi et al (2004), ao avaliarem o uso de cultura de CTE misturadas a colágeno em defeitos periodontais de cães, observaram que a técnica possibilitou não somente a regeneração óssea mas também de cemento e ligamento periodontal, de maneira significativamente superior ao grupo controle onde somente o colágeno foi utilizado. Duailibi et al (2008), trabalhando com a bioengenharia dental, por meio da cultura de CT da polpa dental, conseguiram formar coroas dentais contendo dentina, esmalte, polpa e ligamento periodontal em ratos.

Apesar do reconhecimento de que o CCEMOA repercute em um nível incrementado de células osteogênicas, Krzymanski et al (1997), Martin et al (1997) e Clarke et al (2007) não observaram maior potencial osteogênico do CCEMOA quando comparado ao EMOAF. Os autores sugeriram que células osteogênicas não são o único fator responsável pelo crescimento ósseo e que, possivelmente, a MO fornece fatores de crescimento às CT. No entanto, Petite et al (2000) relataram maior nível de formação óssea quando um substrato (*scaffold*) foi

carreado com CT cultivada da MO em comparação ao carreamento com a MO fresca (*in natura*). Portanto, é preciso reconhecer que o método pelo qual as CTE são isoladas e expandidas, e a escolha do substrato, não são os mesmos ao redor do mundo e isso, obviamente, repercute em diferentes resultados quando da aplicação clínica.

Estudos recentes demonstraram a possibilidade de se modificar geneticamente as CTE, de forma a fazê-las expressar um fator de transcrição ou proteína específica, como por exemplo proteína óssea morfogenética (BMP), osterix ou Cbfa1/Runx2, o que tende a incrementar o seu potencial osteogênico (Caplan, 2000; Turgeman & Pittman, 2001; Jiang et al, 2009; Tang et al, 2008; Tu et al, 2007; Bronckers et al, 2005).

No entanto, segundo Kotobuki et al (2004), ainda não foram estabelecidos marcadores definitivos para CTE - apenas a característica de serem células fibroblásticas aderentes da MO - o que pode repercutir na falta de padronização entre diferentes estudos. Segundo Lucarelli et al (2004), do ponto de vista morfológico, as CTE podem ter vários fenótipos e, apesar de muitos esforços nenhum foi capaz de identificar uma proteína e, posteriormente, um anticorpo que poderia especificamente identificar estas células. Isto torna difícil uma comparação de resultados conduzidos em diferentes instituições.

OBJETIVOS

Avaliar a eficácia da utilização do enxerto de medula óssea *in natura* em alvéolos frescos íntegros de pacientes submetidos a procedimentos de exodontia dos dentes anteriores superiores.

PACIENTES E MÉTODOS

1. Pacientes

Os pacientes abordados neste estudo foram provenientes do Ambulatório de Odontologia do Centro de Hematologia e Transfusão de Sangue da Universidade de Campinas – UNICAMP. Todos eles tinham necessidade de extração de dentes anteriores superiores (incisivos e/ou caninos) por diferentes razões. No total treze pacientes (7 homens e 6 mulheres), com idade variando de 28 a 70 anos (média $47,5 \pm 10,3$ anos), com trinta dentes anteriores com extrações indicadas foram englobados pelo estudo. Eles foram randomizados em dois grupos: sete pacientes com quinze dentes a serem extraídos no grupo teste (GT) e seis pacientes com quinze dentes a serem extraídos no grupo controle (GC) (TABELA 1). Foi considerado um pré requisito o fato dos pacientes estarem com uma boa saúde geral, sem contra indicações ao tratamento, exibirem um bom padrão de higiene bucal e necessitarem de pelo menos duas extrações de dentes anteriores superiores. Critérios de exclusão incluíram pacientes com complicações sistêmicas, fumantes, grávidas, imunossuprimidos, diabéticos, e presença de alvéolos dentais com severa perda óssea. Os pacientes que preencheram estes critérios assinaram um consentimento informado (vide Anexo 1).

Paciente	Gênero	Dentes	Idade	Grupo
1	F	21,22	51 anos	Teste
2	F	11, 21	54 anos	Teste
3	M	11, 12	52 anos	Teste
4	M	11, 21	28 anos	Teste
5	M	23,22,11,13	48 anos	Controle
6	F	12, 22	52 anos	Teste
7	M	21,22,23	50 anos	Teste
8	M	12, 22	70 anos	Controle
9	M	11, 22	39 anos	Controle
10	M	11, 22	47 anos	Controle
11	F	11, 21	40 anos	Controle
12	F	11, 12, 21	51 anos	Teste
13	F	11, 21	36 anos	Controle

2. Protocolo cirúrgico

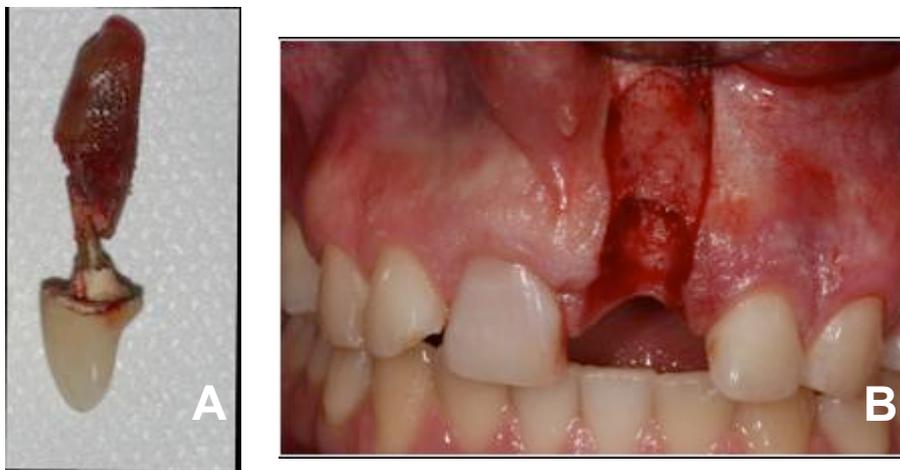
Antes do procedimento odontológico, os pacientes randomizados no GT tiveram 5 ml de MO aspirada do íliaco (FIGURA 2) por hematologistas do Centro de Hematologia e Transfusão de Sangue da Universidade de Campinas – UNICAMP. Para obtenção da medula óssea foi realizado, após antissepsia da pele com digluconato de clorexidina a 2% e anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, uma punção na crista ilíaca posterior superior com uso de uma agulha para aspiração de MO de 40 x 12 mm (Lee-Lok, Minneapolis, USA) conectada a uma seringa de 20 ml contendo 1 ml de heparina, para se evitar a coagulação sanguínea. Após aspiração da medula a seringa foi desconectada e invertida várias vezes para garantir a homogeneização da mistura.



FIGURA 2- Aspiração da medula óssea

Em todos os pacientes, após antissepsia da cavidade oral com bochecho de digluconato de clorexidina a 0,12% e administração de anestesia local pelo uso de lidocaína a 2% com adrenalina 1:100000, foi realizada uma incisão intra sulcular ao redor do dente e a extração foi executada de forma menos traumática possível, com o auxílio de um periótomo. Foram feitas duas incisões verticais relaxantes nos ângulos mesio e disto vestibulares do alvéolo as quais foram

estendidas até a junção muco gengival. Posteriormente ao rebatimento do retalho vestibular de espessura total, foi realizada curetagem da região apical quando existia a presença de tecido de granulação (FIGURAS 3 a,b).



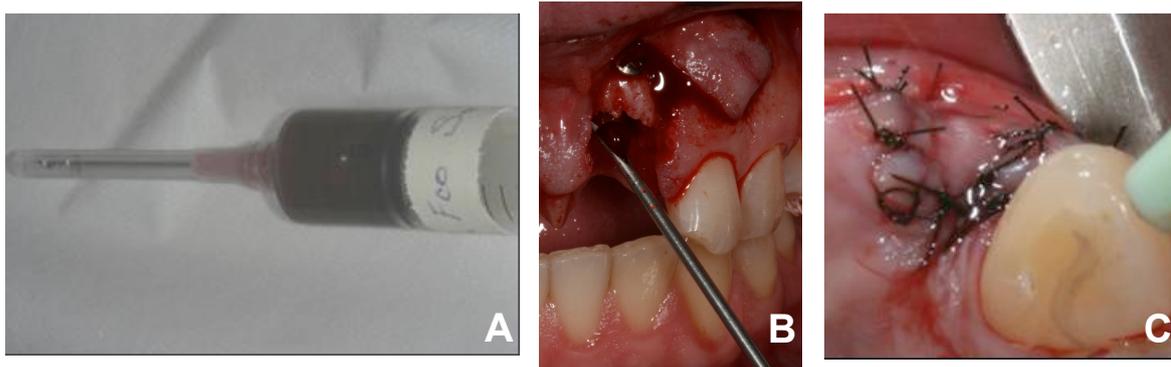
FIGURAS 3 a,b- Remoção do dente (a) e rebatimento de um retalho de espessura total (b)

Na sequência, foi feita uma perfuração nas tábuas ósseas vestibular e palatina, com auxílio de uma fresa de 1,2 mm, em uma distância que variou de 1 a 4 mm do bordo coronário da tábua óssea vestibular. Através desta perfuração foi inserido um parafuso de titânio (IMPLAC, São Paulo, Brasil) que foi fixado na tábua óssea palatina. Este parafuso serviu como um ponto de referência para avaliação da perda óssea, seguindo metodologia similar a de Lekovic et al (1998). As primeiras mensurações de altura e espessura foram realizadas durante este processo (FIGURAS 4 a, b, c, d).



FIGURAS 4 a, b, c, d- Fixação do parafuso (a); Mensuração clínica vertical externa (b); Mensuração clínica vertical interna (c); Mensuração clínica horizontal (d)

Os pacientes do grupo teste tiveram seus alvéolos enxertados com medula óssea autóloga (FIGURA 5 a, b) e nos pacientes do grupo controle nada foi enxertado. Após a realização de uma incisão periosteal de alívio o retalho foi suturado com suturas de nylon 5-0 com o intuito de se obter uma cicatrização por primeira intenção (FIGURA 5 c). As suturas foram removidas após dez dias do procedimento .

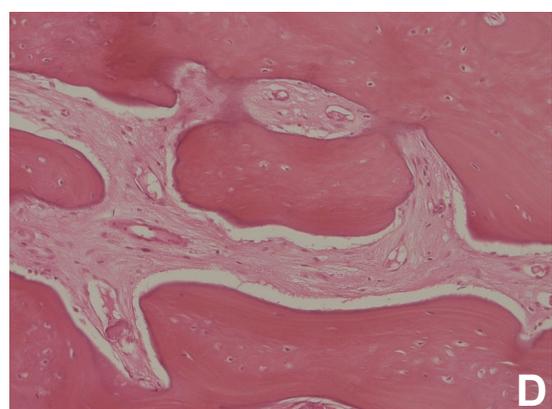
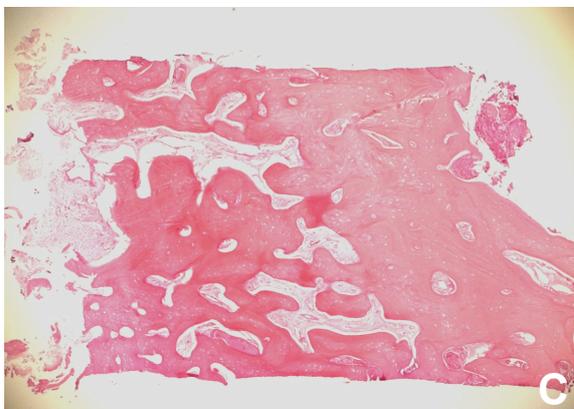
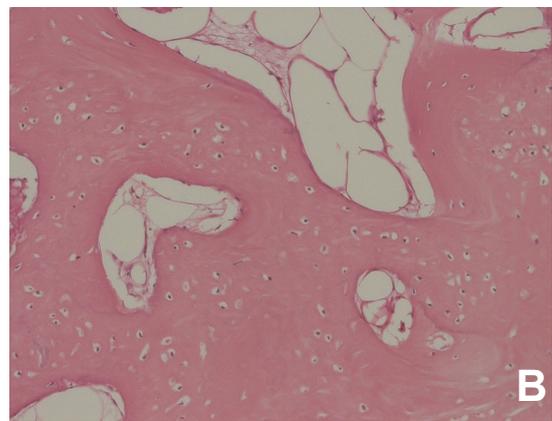
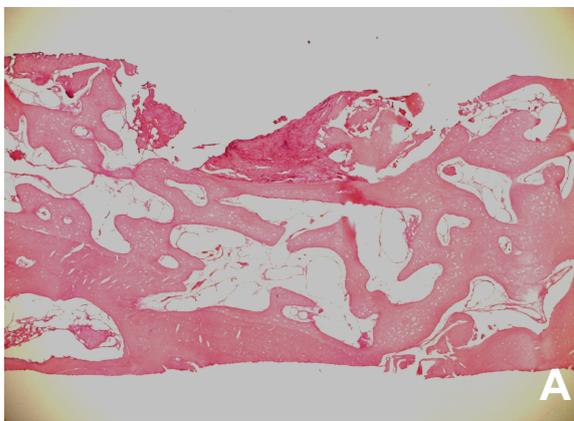


FIGURAS 5 a, b, c- Medula óssea autóloga coletada(a); Preenchimento do alvéolo com medula óssea no grupo teste (b); Sutura (c)

Os procedimentos de reabertura para instalação dos implantes foram feitos após seis meses. Durante este tempo os pacientes fizeram uso de próteses fixas provisórias ou permaneceram sem qualquer tipo de prótese. Neste momento, as mensurações clínicas finais foram realizadas seguindo-se as mesmas técnicas descritas a seguir (no ítem 3 “Avaliação da perda óssea”). Previamente à instalação do implante (IMPLAC, São Paulo, Brasil), o parafuso inserido previamente foi retirado e 30 espécimes ósseos de aproximadamente 7mm x 2mm foram removidos com auxílio de uma broca trefina empregada como uma broca piloto, no longo eixo do sítio tratado, de forma a ultrapassar apicalmente o orifício presente por razão da remoção dos parafusos de titânio (FIGURAS 6 a,b). Posteriormente os espécimes foram preparados para avaliações histológicas e histomorfométricas (FIGURAS 7 a, b, c, d).



FIGURAS 6 a, b- Remoção do espécime com fresa trefina (a); Implante utilizado no estudo (b)



FIGURAS 7 a, b, c, d- Vista histológica: Grupo teste HE-50x e HE-200x (a, b respectivamente)
Grupo controle HE-50x e HE-200x (c, d respectivamente)

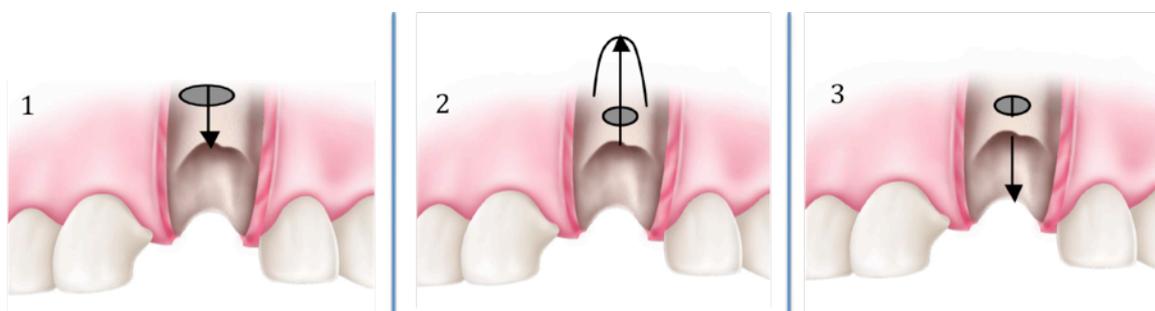
Todos os pacientes foram orientados a fazer uso de gelo local durante um período de até 4 horas pós operatório e a utilizar um analgésico por via oral (Paracetamol 750mg a cada 6 horas, durante 2 dias).

O protocolo desta pesquisa em humanos foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Campinas – UNICAMP (vide Anexo 2).

3. Avaliação da perda óssea

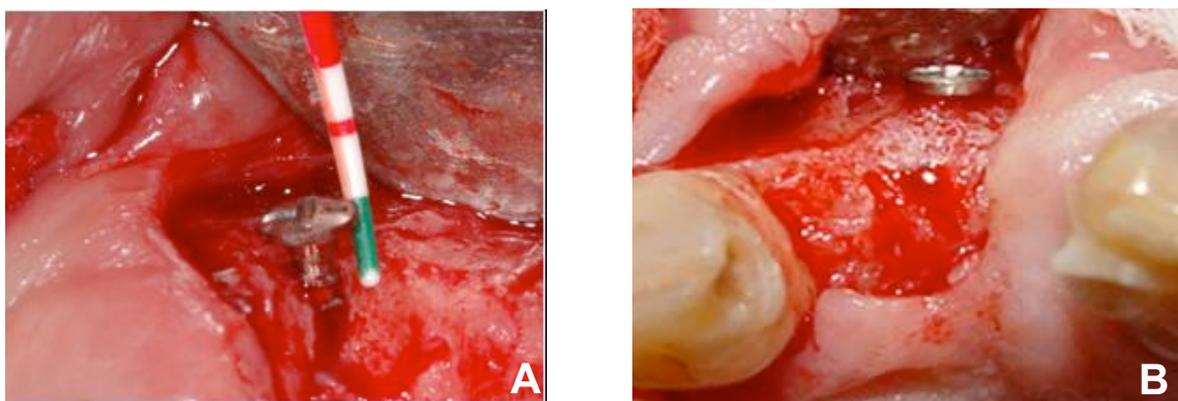
Para avaliação da perda óssea foram realizadas cinco mensurações com o uso de uma sonda periodontal. A primeira, chamada de medida clínica vertical externa (MCVE), foi mensurada da cabeça do parafuso até o bordo coronário da tábua óssea vestibular do alvéolo (FIGURA 4b e ESQUEMA 1). A segunda mensuração foi chamada de medida clínica vertical interna (MCVI), representando a distância do limite mais apical do alvéolo para com o bordo coronário da tábua óssea vestibular (FIGURA 4c e ESQUEMA 2). Estas duas mensurações representaram os níveis de altura do osso alveolar.

A espessura alveolar, chamada de medida clínica horizontal (MCH), foi considerada uma terceira mensuração e foi obtida medindo-se a distância entre os bordos vestibular e palatal das tábuas óssea alveolares (FIGURA 4d e ESQUEMA 3). Os resultados obtidos por meio destas mensurações iniciais foram considerados como um baseline em relação à avaliação da perda óssea, realizada após seis meses.



ESQUEMAS 1, 2, 3. Medida clínica vertical externa (MCVE) [1]; Medida clínica vertical interna (MCVI) [2]; Medida clínica horizontal (MCH) [3]

As últimas duas medidas do estudo, a perda óssea vestibular (POV) e a perda óssea palatina (POP), foram feitas somente durante a cirurgia de reabertura (após 6 meses da extração, no ato da instalação do implante). A primeira foi realizada medindo-se a distância da cabeça do parafuso até a tábua óssea vestibular e a segunda pela subtração do valor da medida clínica horizontal-MCH com a perda óssea vestibular-POV (FIGURAS 8 a, b).



FIGURAS 8 a, b- Perda óssea vestibular em sítios dos grupos controle (a) e teste (b).
Notar o maior nível de reabsorção vestibular presente no GC.

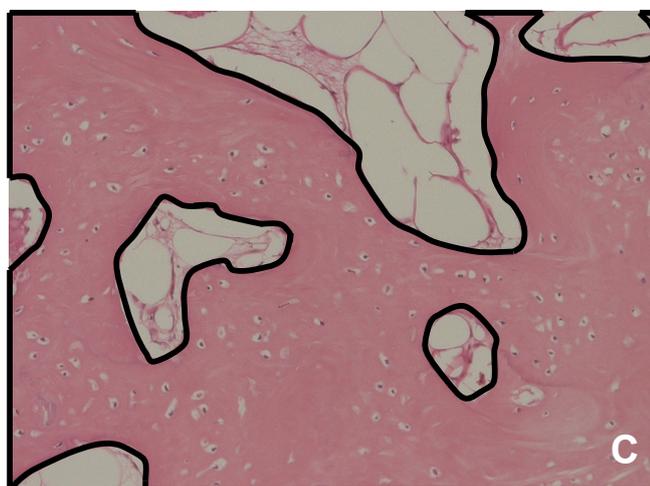
Para cada paciente foi obtida uma média das mensurações alveolares e realizou-se uma comparação estatística entre os sítios do grupo teste e do grupo controle em baseline e seis meses pós operatórios, pelo uso de testes de Wilcoxon não pareados. As comparações intra grupos entre baseline e seis meses pós operatórios foram realizadas pelo uso de testes de Wilcoxon pareados.

4. Preparação dos espécimes

Os 30 espécimes foram fixados por 72 horas em formol a 10%. Eles foram descalcificados e embebidos em parafina. Posteriormente, secções planas de 5µm foram preparadas e coradas por Hematoxilina-eosina (FIGURAS 7 a, b, c, d).

5. Avaliação histomorfométrica

As lâminas foram submetidas à avaliação histomorfométrica pelo uso do software Carl Zeiss Axio Vision (Release 4.7.1) e da AxioCam HRc adaptada ao microscópio Axioscop 2 plus (Carl Zeiss; Germany). Por meio desta análise foi possível quantificar o percentual de tecido ósseo mineralizado e de tecido não mineralizado (FIGURAS 9 a, b, c).



FIGURAS 9 a, b, c- Equipamento utilizado para avaliação histomorfométrica (a, b)

Delineamento do tecido mineralizado para histomorfometria (c)

RESULTADOS

A comparação estatística para gênero e idade entre os dois grupos foi realizada por meio do teste de Fisher e ambas foram consideradas estatisticamente não significantes ($p > 0,05$) (TABELA 2).

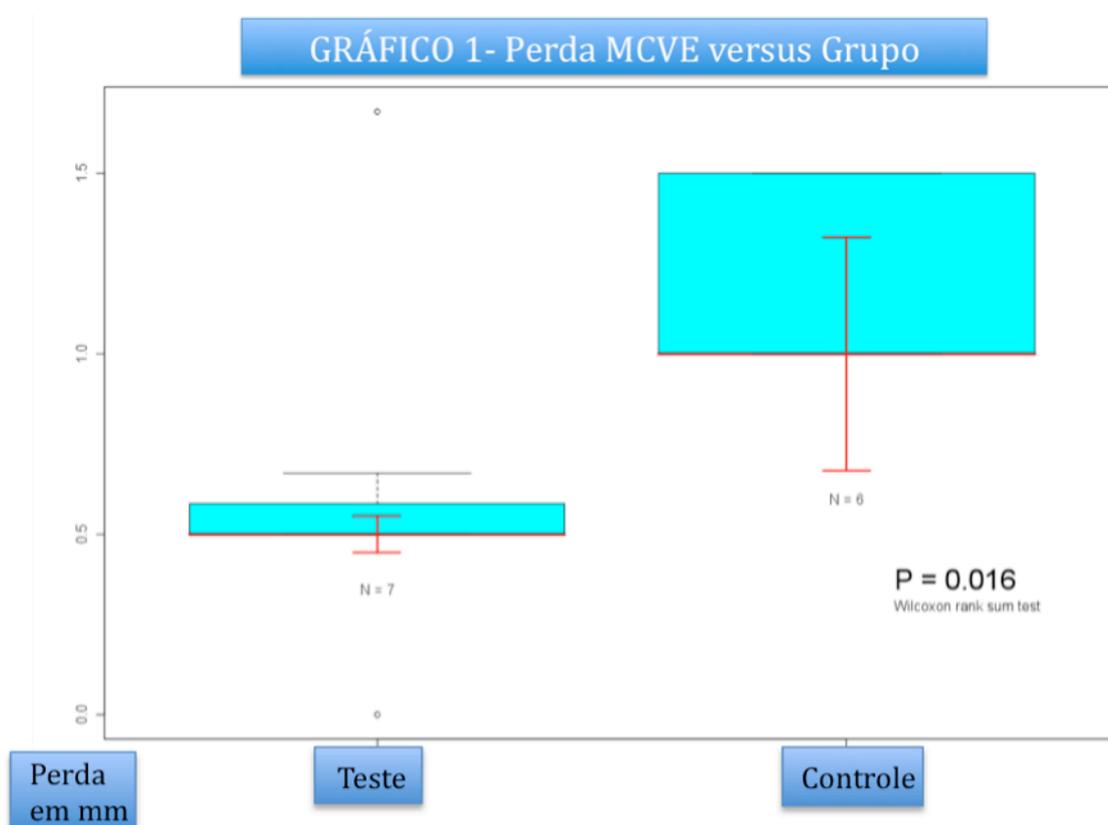
	Gênero	Idade Mínima	Idade Mediana	Idade Máxima
Grupo Teste	4F, 3M	28 anos	51 anos	70 anos
Grupo Controle	2F, 4M	36 anos	43,5 anos	54 anos
P	0,592	0,11		

Todos os sítios cirúrgicos cicatrizaram bem. Os pacientes relataram desconforto nulo ou mínimo com relação à aspiração da MO. As mensurações de altura e espessura antes e após 6 meses da extração e o cálculo das perdas ósseas foi possível por meio da técnica descrita e é mostrada na tabela 3.

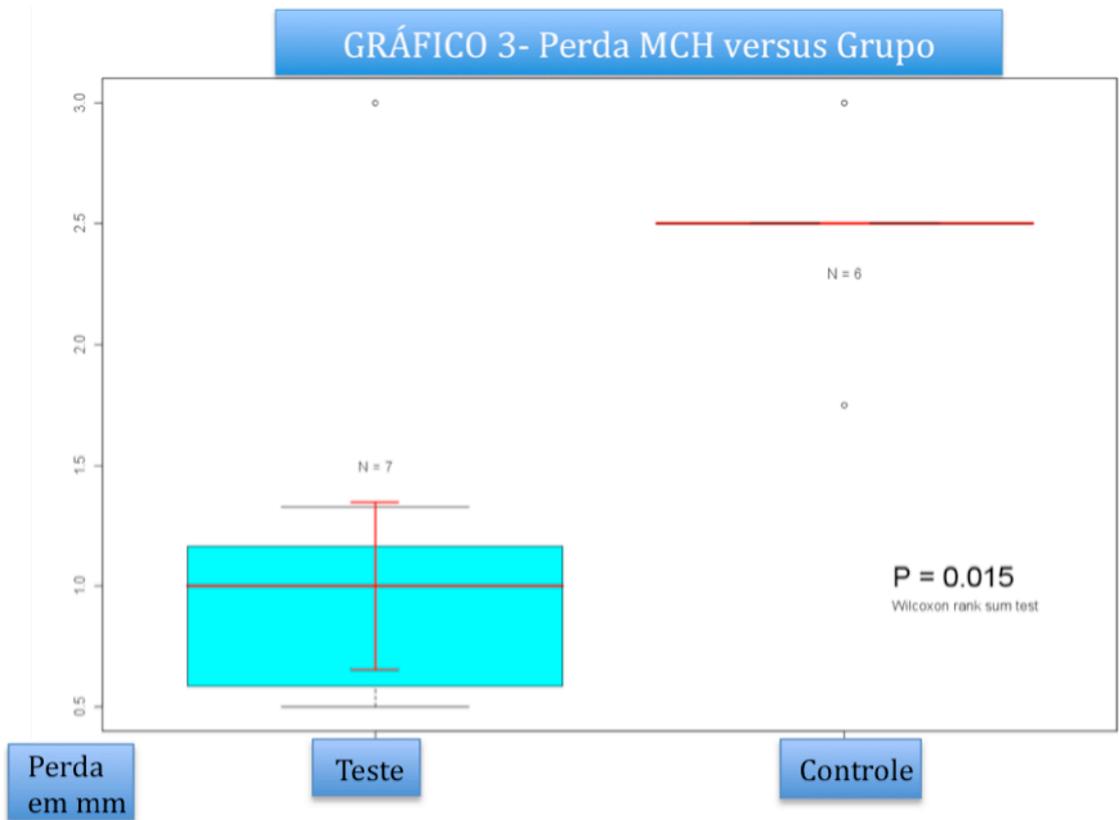
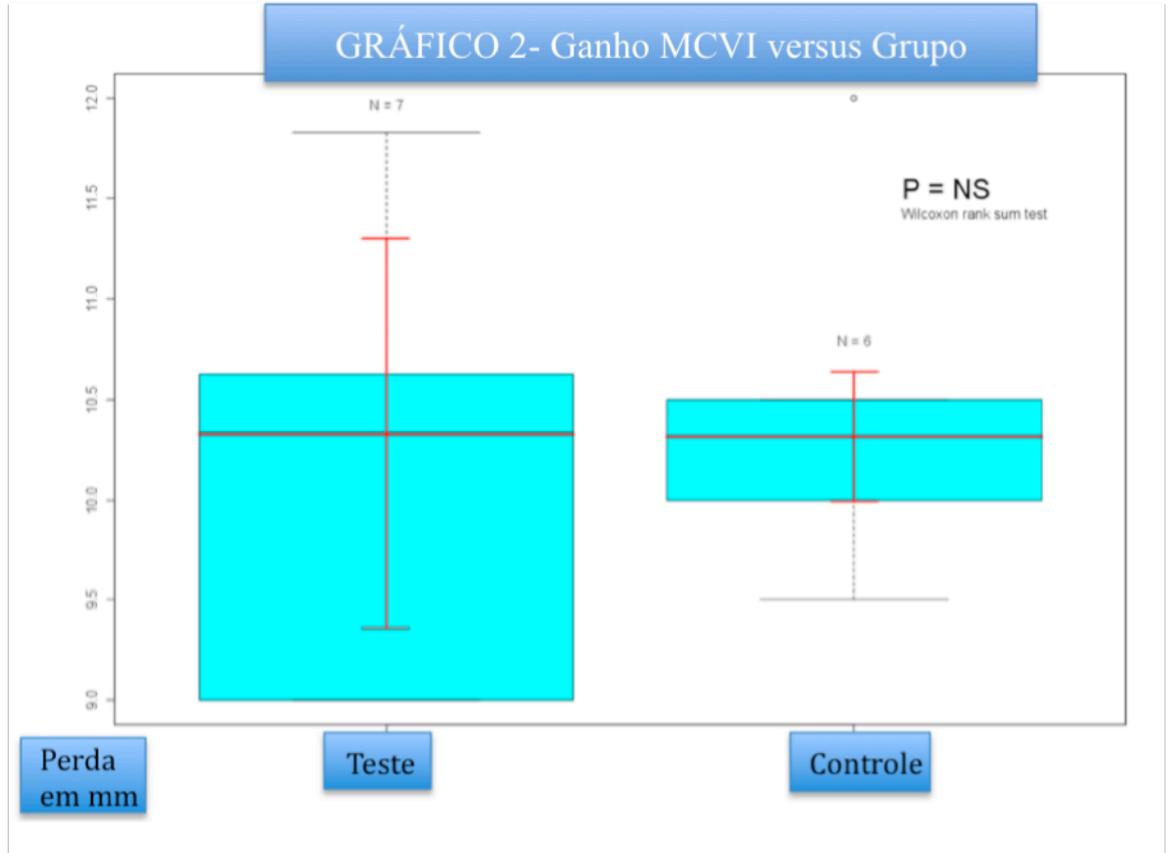
Paciente	Grupo	MCVE			MCIV			MCH		
		Baseline	Diferença	6 meses	Baseline	Diferença	6 meses	Baseline	Diferença	6 meses
1	GT	2	0,5	1,5	9,5	9	0,5	6,5	1	5,5
2	GT	2	0,5	1,5	11	10,75	0,25	7	0,5	6,5
3	GT	3	0,5	2,5	9	9	0	7	0,5	6,5
4	GT	2,5	0	2,5	9	9	0	8,5	3	5,5
5	GC	2,75	1,5	1,25	10,75	10,38	0,38	8,25	1,75	6,5
6	GT	3	0,5	2,5	11	10,5	0,5	7	1	6
7	GT	2,67	1,67	1	12	11,83	0,17	7,67	0,67	7
8	GC	2,5	1,5	1	9,5	9,5	0	7	3	4
9	GC	2,5	1	1,5	10,5	10,25	0,25	7,5	2,5	5
10	GC	3	1	2	11	10,5	0,5	7	2,5	4,5
11	GC	2	1	1	10,5	10	0,5	7,5	2,5	5
12	GT	3	0,67	2,33	10,33	10,33	0	8	1,33	6,67
13	GC	2	1	1	12	12	0	7	2,5	4,5
Média±DP	GT	2,6±0,45	0,62±0,51	1,98±0,63	10,26±1,15	10,06±1,1	0,2±0,22	7,38±0,7	1,14±0,87	6,24±0,58
	GC	2,46±0,4	1,17±0,26	1,29±0,4	10,71±0,81	10,44±0,84	0,27±0,23	7,38±0,49	2,46±0,4	4,92±0,86

A variação dos parâmetros clínicos entre baseline e seis meses pós operatórios são apresentados na TABELA 4 e GRÁFICOS 1, 2 e 3.

TABELA 4. Variação dos parâmetros clínicos entre baseline e 6 meses (em milímetros) – comparação intragrupos							
Grupo	Parâmetro	Média+DP	N	Mediana	Mínimo	Máximo	p
GT	MCVE	0,62+0,51	7	0,5	1,67	0	0,015
	MCVI	10,06+1,1	7	10,33	11,83	9	0,01
	MCH	1,14+0,87	7	1	3	0,5	0,011
GC	MCVE	1,17+0,26	6	1	1,5	1	0,015
	MCVI	10,44+0,84	6	10,32	12	9,5	0,015
	MCH	2,46+0,4	6	2,5	3	1,75	0,015

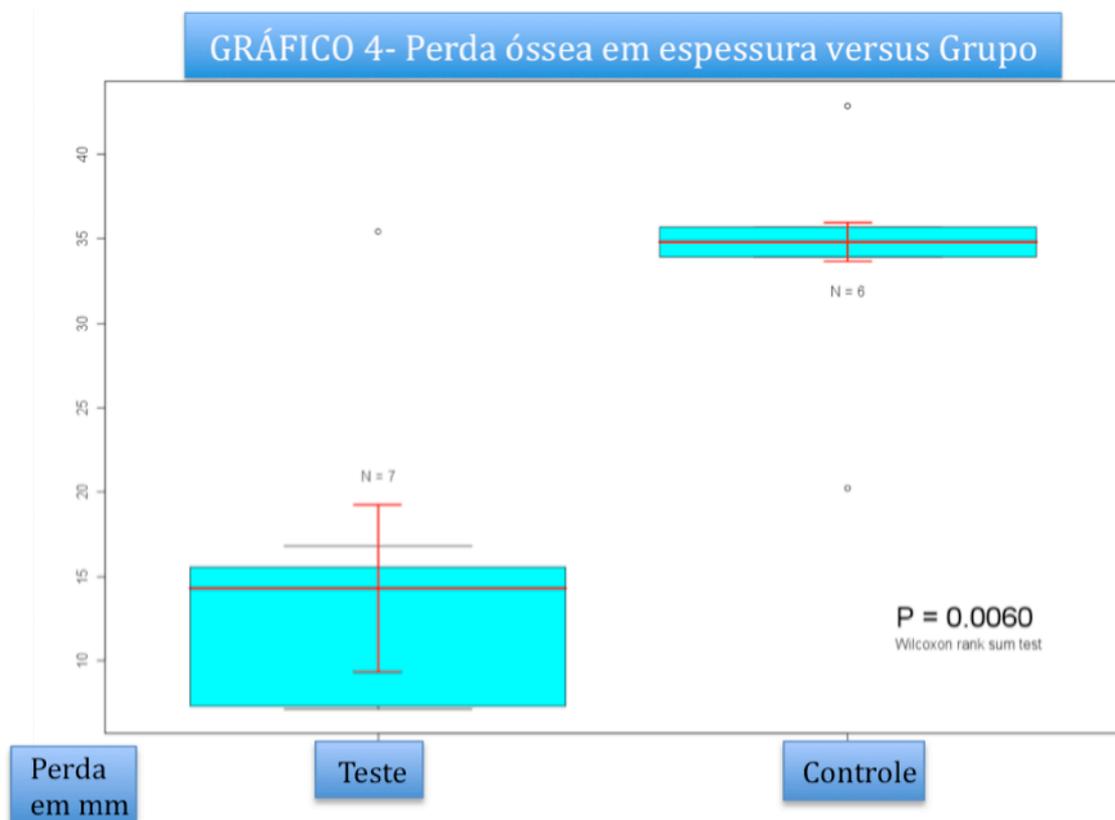


Ganho



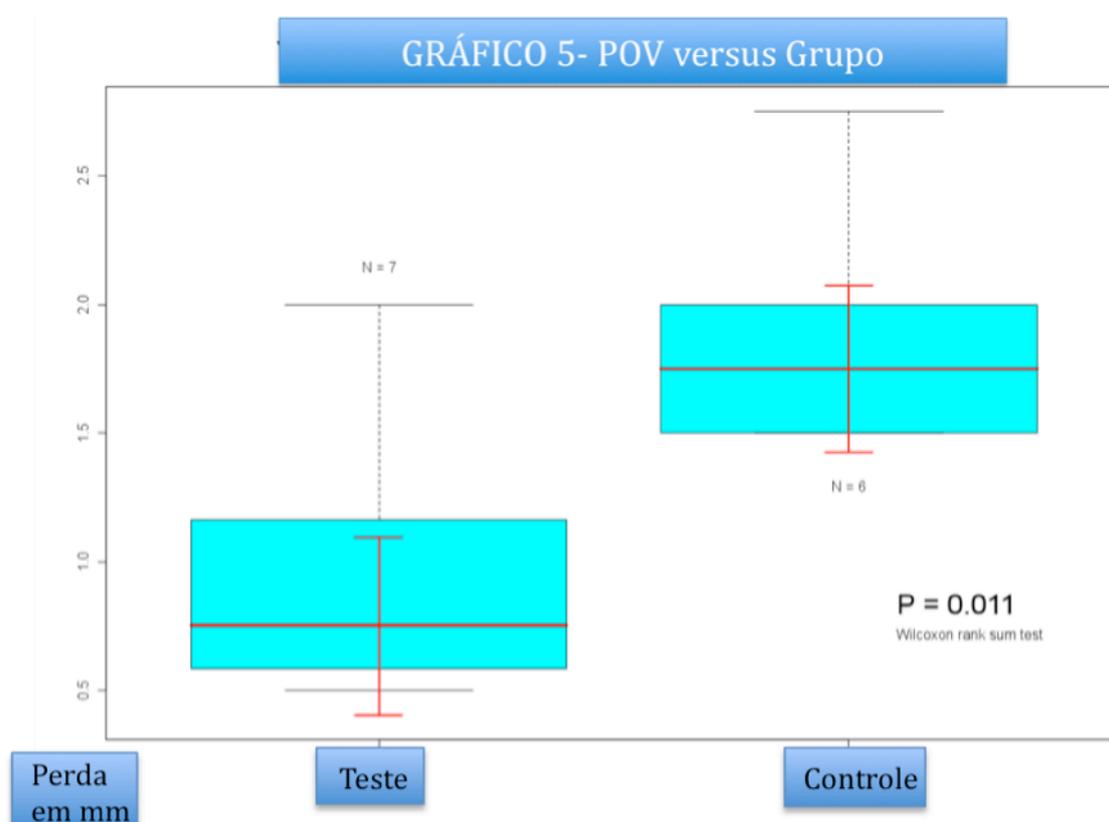
Para ambos os grupos foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa, em todas as mensurações, comparando-se os valores em baseline e seis meses pós operatórios (comparação intra grupo). A porcentagem de perda óssea alveolar é apresentada na TABELA 5 e GRÁFICO 4.

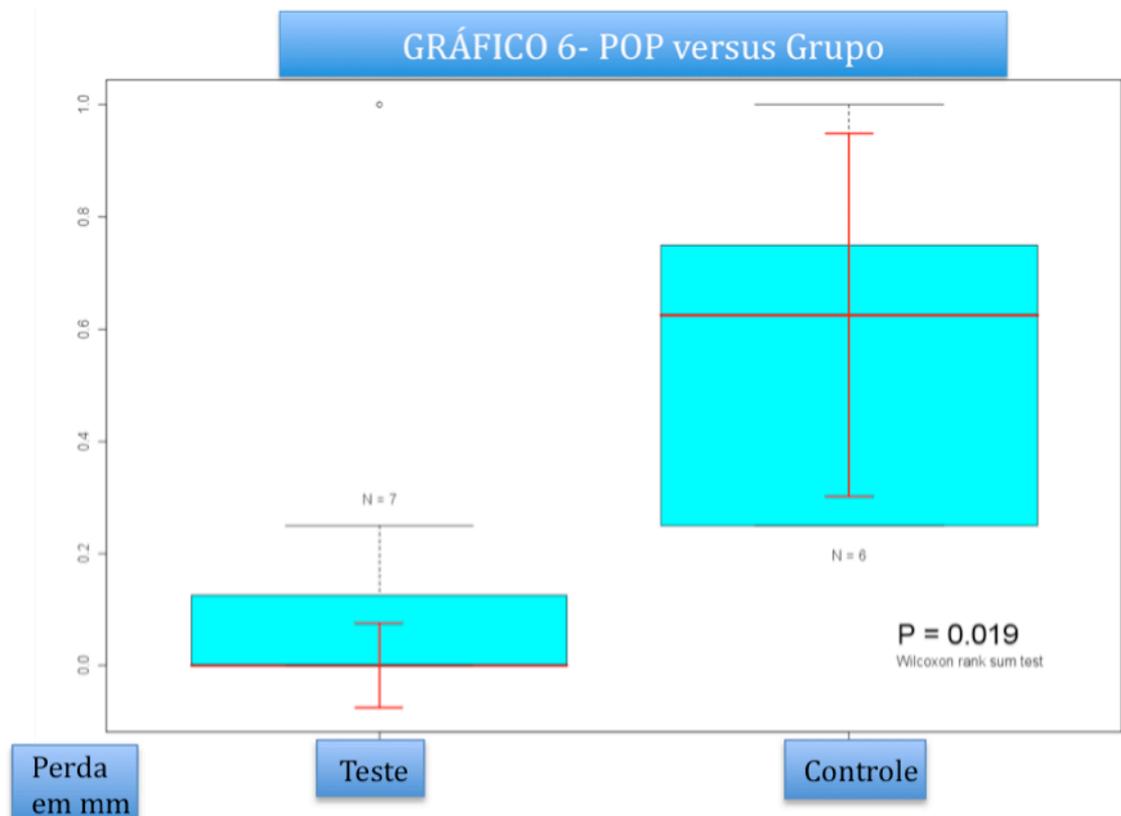
TABELA 5. Perda óssea em espessura (em porcentagem) – comparação intergrupos					
Grupo	N	Mínimo	Mediana	Máximo	Média+DP
GT	7	7,14%	14,28%	35,42%	13,61%+12,51
GC	6	20,24%	34,82%	42,86%	31,35%+11,88
P		P= 0.006			



As perdas específicas por vestibular e palatal são apresentadas na TABELA 6 e GRÁFICOS 5 e 6, respectivamente.

TABELA 6. Perda óssea em espessura vestibular e palatina (em milímetros) – comparação intergrupos			
		Grupo Teste	Grupo Controle
Vestibular	Mediana	0,75	1,75
	Mínimo	0,5	1,5
	Máximo	2	2,75
	Média+DP	0,9+0,81	1,83+0,77
	N	7	6
	P	P= 0,01	
Palatal	Mediana	0	0,62
	Mínimo	0	0,25
	Máximo	1	1
	Média+DP	0,17+0,36	0,5+0,53
	N	7	6
	P	P= 0,018	





Com relação à comparação inter grupos, o GT mostrou melhores resultados, estatisticamente significativos, com relação à preservação alveolar em espessura ($p=0,015$), com $1,14 \pm 0,87$ mm (mediana 1mm) de perda óssea (vide TABELAS 3 e 4 e GRÁFICO 3). Em porcentagem esta perda óssea representa $13,61 \pm 12,51\%$ (mediana 14,28%). O GC obteve maior redução em espessura, com $2,46 \pm 0,4$ mm (mediana 2,5mm) de perda óssea. Em porcentagem esta perda óssea representa $31,35\% \pm 11,88$ (mediana 34,82%), sendo que para os valores relativos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos também foi observada ($p=0,006$) (vide TABELA 5 e GRÁFICO 4). A perda óssea em espessura sempre ocorreu com maior intensidade devido à reabsorção alveolar no sentido vestibulo palatino - com perda de $0,9 \pm 0,81$ mm (mediana 0,75mm) no GT e de $1,83 \pm 0,77$ mm no GC (mediana 1,75mm) – do que no sentido palatino vestibular - com perda de

0,17±0,36mm (mediana 0mm) no GT e de 0,5±0,53 (mediana 0,62mm) no GC (vide TABELA 6 e GRÁFICOS 5 e 6).

A perda óssea em altura da tábua óssea vestibular também foi maior no GC do que no GT ($p=0,016$), $1,17±0,26$ mm (mediana 0,5mm) e $0,62±0,51$ mm (mediana 1mm), respectivamente. O preenchimento interno do alvéolo foi similar em ambos grupos ($p=0,72$), $10,06±1,1$ mm (mediana 10,33) no GT e $10,44±0,84$ mm (mediana 10,32) no GC (vide TABELAS 3 e 4 e GRÁFICOS 1 e 2).

Em cinco sítios do GC foram necessários procedimentos complementares de expansão e/ou enxertia óssea para que fosse possível a instalação de implantes (TABELA 7). Esta necessidade não ocorreu em nenhum dos sítios do GT. Todos os 30 implantes instalados osseointegraram e receberam próteses fixas (FIGURAS 10 a, b).

TABELA 7. Posicionamento de implante com e sem procedimentos secundários de expansão e/ou enxertia óssea		
Procedimento	Grupo Teste	Grupo Controle
Com Expansão Somente	0 (0%)	3 (20%)
Com Expansão e Enxerto	0 (0%)	1 (6,66%)
Com Enxerto Somente	0 (0%)	1 (6,66%)
Sem Expansão e Enxerto	15 (100%)	10 (66,66%)

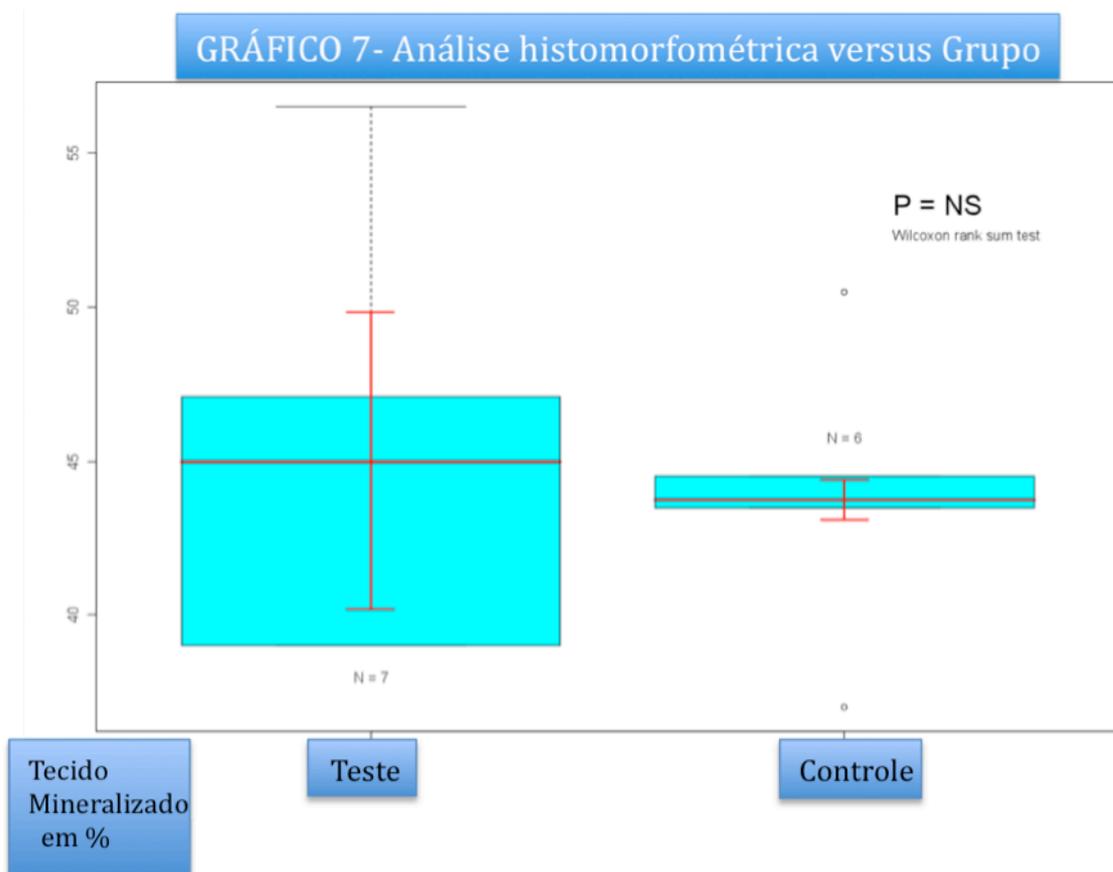


FIGURAS 10 a, b- Instalação de pilar protético sobre implante (a)

Cimentação de coroa provisória sobre pilar protético (b)

Histologicamente não foi observada qualquer característica de processo inflamatório, tanto no GT como no GC. As lâminas de ambos grupos mostraram presença de matriz óssea além de vasos sanguíneos, medula óssea e tecido conjuntivo. Não foi observada formação de nenhum outro tipo de tecido de origem mesenquimal (como músculo ou cartilagem) que não tecido ósseo, em nenhum dos 15 espécimes do GT. As análises histomorfométricas mostraram quantidades similares ($p=0,36$) de osso mineralizado vital tanto no GC como no GT, $42,87\pm 11,33\%$ (mediana 43,75%) e $45,47\pm 7,21\%$ (mediana 45%) respectivamente (TABELA 8 e GRÁFICO 7).

Grupo	N	Média+DP	Mínimo	Mediana	Máximo
GT	7	45,47+7,21	39	45	56,5
GC	6	42,87+11,33	37	43,75	50,50
P				0,36	



DISCUSSÃO

Os estudos sobre preservação do osso alveolar são de grande interesse na Implantodontia. Isto acontece porque em regiões estéticas da bateria anterior existe uma grande perda alveolar em espessura após 6 a 12 meses da exodontia (Johnson, 1963; Johnson, 1969; Lekovic et al, 1998), o que foi confirmado no grupo controle do presente estudo. Apesar do aumento crescente do interesse em instalação de implantes imediatos, vem sendo verificado que esta técnica pode ser afetada negativamente pela ausência de fechamento por tecido mole (Wilson e Weber, 1993), presença de infecção (Rosenquist et al, 1996; Polizzi et al, 2000), e presença de defeitos entre tecido ósseo e implantes (Schropp, 2003). Além disso, segundo Araújo et al (2006), a instalação de um implante imediatamente após a exodontia não assegura manutenção da espessura e altura do osso alveolar. Portanto, o desenvolvimento de técnicas que contribuam para preservação do osso alveolar são de fundamental importância.

Regeneração óssea guiada (Lekovic et al, 1997; Lekovic et al, 1998), enxertos ósseos (Iasella et al 2003; Camargo et al, 2000) e outros biomateriais (Fiorellini et al, 2005; Shi et al, 2007) vêm sendo testados em alvéolos frescos para se minimizar a perda óssea em espessura ou para se obter, se possível, a conquista da preservação total da arquitetura alveolar sem os altos níveis de morbidade relacionadas aos enxertos ósseos autógenos. No entanto, os biomateriais substitutos do enxerto autógeno (sintéticos, alógenos e xenógenos) não têm potencial osteogênico. Além do mais, uma larga proporção da capacidade osteogênica do enxerto ósseo autógeno se deve à MO presente no mesmo (Burwell, 1964; Burwell, 1966; Nade, 1977; Gray & Elves, 1979; Gray & Elves, 1982; Cummine et al, 1983). Portanto, a perspectiva de se utilizar o EMOAF, cujo

processo de coleta não apresenta altos níveis de morbidade, como descrito neste estudo, é estimulante no campo da engenharia dos tecidos.

A MO adulta possui CT que podem ser induzidas a se diferenciarem em uma variedade de outras células que formarão progenitores hematopoiéticos e mesenquimais. Portanto, a medula pode produzir não somente células sanguíneas assim como outras células indiferenciadas capazes de formar outros tecidos, como osso e cartilagem (Schliephake et al, 2001; Lemoli et al, 2005). Enquanto os progenitores do tecido conjuntivo são residentes em diversos tecidos, a MO representa o mais rico e efetivo repositório de células progenitoras capazes de se diferenciarem em células maduras formadoras de osso (Fleming Jr et al, 2000; Muschler & Midura, 2002). Especula-se neste estudo que a melhor preservação alveolar obtida no GT deste estudo deva ser relacionada à presença destas células no aspirado. Entretanto, existem outros fatores na MO que podem contribuir para a cicatrização óssea como a presença de outras células e um número de fatores de crescimento.

A escolha pelo uso da técnica do EMOAF no presente estudo, sem associação a nenhum tipo de arcabouço mecânico (*scaffold*) com estrutura tridimensional, se deve ao fato do alvéolo fresco não ser considerado um defeito ósseo crítico, pois apresenta paredes ósseas remanescentes (Kok et al, 2005), e pelo fato da cicatrização do alvéolo ser retardado pelo uso de biomateriais osseocondutores (Becker et al, 1998). Quando da abordagem de um defeito ósseo crítico o uso conjunto de um scaffold vem sendo preconizado (Chen et al, 2007; Cerruti Filho et al, 2007; Giannoni et al, 2008; Torigoe et al, 2009) e, talvez, a possibilidade de se trabalhar com um número maior de CTE, por meio de cultura celular, possa vir a representar a melhor alternativa à enxertia óssea autógena.

Entretanto, a aplicabilidade clínica rotineira da cultura celular pode esbarrar no custo inerente à técnica e no fato da necessidade da espera de alguns dias ou mesmo semanas entre a aspiração e reimplantação das células, o que requer dois procedimentos cirúrgicos separados (Lucarelli et al, 2004). Outro questionamento sobre a necessidade ou não de se cultivar as células é a falta de informação sobre o número mínimo de células requeridas para promoção do reparo ósseo.

No presente estudo a análise histomorfométrica mostrou quantidades similares de osso mineralizado vital, tanto no GC como no GT, $42,87 \pm 11,33\%$ (mediana 45%) e $44,47 \pm 7,21\%$ (mediana 43,75%) respectivamente. Estes níveis são próximos àqueles observados por outros autores que estudaram a cicatrização alveolar com análises histomorfométricas (Smukler et al, 1999; Froum et al, 2002). Isto sugere que, a despeito da melhor manutenção do volume ósseo pelo uso do EMOAF, a qualidade e características histológicas do novo osso formado são as mesmas de um sítio cicatrizado que não foi enxertado. Não foi observado histologicamente formação de outro tecido de origem mesenquimal que não o ósseo, fato este já esperado pelo conhecimento prévio de que a diferenciação das CTE ocorre de acordo com as condições fisiológicas locais, no sítio do transplante (Gurevitch et al, 2003).

O método apresentado neste estudo, onde um parafuso de titânio foi utilizado, é uma modificação do método de Lekovic et al (1998) onde tachinhas de titânio foram posicionadas na tábua óssea vestibular e serviram como pontos de referência fixos para mensurações. A mudança de tachinhas de titânio por parafusos de titânio tem três motivos: (1) a tachinha de titânio se movimenta em uma posição palatal pelo processo cicatricial, acompanhando a tábua óssea vestibular. O parafuso de titânio, devido à fixação na tábua óssea palatal, não se

move permitindo uma facilitada percepção e mensuração da perda óssea em espessura; (2) dependendo da espessura da tábua óssea vestibular, em algumas ocasiões, a tachinha de titânio não apresenta uma estabilidade adequada, mas os parafusos de titânio fixados na tábua óssea palatal, que normalmente é mais espessa do que a vestibular, garante um alto nível de estabilidade; e (3) o uso dos parafusos de titânio dão a oportunidade de se mensurar a perda óssea em espessura tanto da tábua vestibular como da palatal, o que não é possível com tachinhas de titânio fixados somente na tábua óssea vestibular. Este tipo de metodologia elimina a necessidade do uso de tomografias computadorizadas, reduzindo-se custos e prevenindo-se as inerentes doses de radiação.

Fazendo-se um paralelo com o trabalho de Lekovic et al (1998) pode-se verificar, tanto no GT como no GC, algumas disparidades. O preenchimento interno do alvéolo verificado pela MCVI do GT e GC, nos dois tempos cirúrgicos, foi superior no presente trabalho e a perda em espessura do grupo controle do trabalho de Lekovic et al (1998), verificado pela MCH nos dois tempos cirúrgicos, foi superior. Isso pode ser o resultado da técnica de exodontia empregada, sendo à fórceps no trabalho de Lekovic et al (1998) e realmente minimamente traumática, com periótomo, no presente estudo. Outra possível explicação pode ser a modificação metodológica que introduzimos, ou seja, a presença de um parafuso de titânio atravessando o alvéolo. Talvez o contato simultâneo do parafuso com as duas tábuas ósseas e o fato das CTE possuírem habilidade de se aderirem à superfície o titânio (Leonardi et al, 2008) possa ter contribuído para uma menor perda óssea em espessura no GC do presente estudo.

Com relação à maior perda óssea alveolar em espessura do que em altura após a exodontia, os achados deste estudo estão de acordo com outros (Johnson,

1969; Lekovic et al, 1998; Camargo et al, 2000). No entanto, à despeito da maior contribuição da perda óssea vestibular neste processo, este estudo demonstrou algum nível de perda óssea em espessura por palatino, o que foi minimizado pelo uso do enxerto de medula óssea autóloga. Os resultados melhores do GT na manutenção da espessura alveolar foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,015$) e, por prevenir a necessidade de procedimentos complementares de expansão e/ou enxertia óssea, deve ser considerado de relevância clínica.

Uma outra possível repercussão do uso de CT da MO em Implantodontia seria o alcance de um maior nível de osseointegração dos implantes odontológicos, o que não foi avaliado no presente estudo por questões éticas relacionadas aos experimentos em seres humanos. Este incremento na osseointegração vem sendo sugerido por alguns estudos em modelo animal (Lucarelli et al, 2005; Yamada et al, 2004; Chen et al, 2007; Chen et al, 2005).

A ideia de se utilizar células tronco da MO para regeneração óssea está crescendo nos últimos anos com, basicamente, três possibilidades: pelo uso do enxerto de medula óssea autóloga fresca *in natura* (EMOAF), pelo uso de um concentrado de células da medula óssea autóloga (CMOA), ou pelo isolamento e cultivo *in vitro* de células estromais da medula óssea autóloga (CCEMOA). A improvável possibilidade de contaminação proporcionada pelo uso do EMOAF aliada à característica cicatricial não crítica do alvéolo fresco repercutiu - no presente estudo clínico pioneiro com CTE transplantadas em alvéolos de humanos - na opção por esta técnica de obtenção de CTE. Apesar de muitos autores sugerirem que o CCEMOA poderia maximizar os resultados regenerativos (Kok et al, 2005; Kadiyala, 1997; Bruder et al, 1998; Bruder et al,

1998; Bruder et al 1998), a efetividade de seu uso em se preservar o osso alveolar após extração dental em humanos ainda precisa ser determinada.

Espera-se, em um futuro não muito distante, que a preocupação de se manter uma adequada espessura do osso alveolar para posterior instalação de implantes seja substituída pela eficácia de uma bioengenharia que proporcione o implante de células com potencial de criar, concomitantemente, tecido ósseo alveolar e órgão dental, o que já foi esboçado em modelo animal por Abukawa et al (2009).

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que o enxerto de medula óssea autóloga pode contribuir com o reparo ósseo alveolar após a extração dental, especificamente minimizando a quantidade da perda óssea em espessura e altura, e reduzindo-se as possibilidades de se ter que indicar procedimentos complementares de expansão e/ou enxertia óssea para instalação de implantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA H, ZHANG W, YOUNG CS, ASRICAN R, VACANTI JP, KABAN LB, TROULIS MJ, YELICK PC. Reconstructing mandibular defects using autologous tissue-engineered tooth and bone constructs. **J Oral Maxillofac Surg** 2009; 67: 335-347.

AMLER MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1969; 27: 309-318.

ARAÚJO MG, LINDHE J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol** 2005; 32: 212-218.

ARAÚJO MG, WENNSTROM JL, LINDHE J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. **Clin Oral Implants Res** 2006; 17: 606-614.

ARAÚJO MG, SUKEKAVA F, WENNSTROM JL, LINDHE J. Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. **Clin Oral Implants Res** 2006; 17: 615-624.

ARAÚJO MG, LINDHE J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. **Clin Oral Implants Res** 2009; 20: 433-440.

ARAÚJO MG, LINDHE J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: an experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res** 2009; 20: 545-549.

ARAÚJO MG, LINDER E, LINDHE J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. **Clin Oral Implants Res** 2009; 20: 1-6.

BECKER W, CLOKIE C, SENNERBY L, URIST MR, BECKER BE. Histologic findings after implantation and evaluation of different grafting materials and titanium micro screws into extraction sockets: case reports. **J Periodontol** 1998; 69: 414-421.

BLOCK JE. The role and effectiveness of bone marrow in osseous regeneration. **Med Hypotheses** 2005; 65: 740-747.

BRKOVIC BMB, PRASAD HS, KONANDREAS G, MILAN R, ANTUNOVIC D, SÁNDOR GKB, ROHRER MD. Simple preservation of a maxillary extraction socket using beta-tricalcium phosphate with type I collagen: preliminary clinical and histomorphometric observations. **J Can Dent Assoc** 2008; 74: 523-528.

BRONCKERS AL, SASAGURI K, CAVENDER AC, D'SOUZA RN, ENGELSE MA. Expression of Runx2/Cbfa1/Pebp2alphaA during angiogenesis in postnatal rodent and fetal human orofacial tissues. **J Bone Miner Res** 2005; 20: 428-437.

BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J Cell Biochem** 1997; 64: 278-294.

BRUDER SP, KURTH AA, SHEA M, HAYES WC, JAISWAL N, KADIYALA S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. **J Orthop Res** 1998; 16: 155-162.

BRUDER SP, RICALTON NS, BOYNTON RE et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. **J Bone Miner Res** 1998; 13: 655-663.

BRUDER SP, JAISWAL N, RICALTON NS, MOSCA JD, KRAUS KH, KADIYALA S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. **Clin Orthop Relat Res** 1998; 355(suppl):S247-S256.

BURWELL RG. Studies in the transplantation of bone. 7. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to

osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. **J Bone Joint Surg Br** 1964; 46: 110-140.

BURWELL RG. Studies in the transplantation of bone. 8. Treated composite homograft-autografts of cancellous bone: an analysis of inductive mechanisms in bone transplantation. **J Bone Joint Surg Br** 1966; 48: 532-566.

BUSER D, INGIMARSSON S, DULA K, LUSSI A, HIRT HP, BELSER UC. Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2002, 22: 109-17.

CAMARGO PM, LEKOVIC V, WEINLAENDER M, KLOKKEVOLD PR, KENNEY EB, DIMITRIJEVIC B, NEDIC M, JANCOVIC S, ORSINI M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontias. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2000; 90: 581-586.

CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells and gene therapy. **Clin Orthop** 2000; (Suppl 379): S67-70.

CARLSSON GE, PERSSON G. Morphologic changes of the mandible after extraction and wearing of dentures. A longitudinal, clinical, and x-ray cephalometric study covering 5 years. **Odontol Revy** 1967; 18: 27-54.

CERRUTI FILHO H, KERKIS I, KERKIS A, TATSUI NH, COSTA NEVES A, BUENO DF, da SILVA MCP. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. **Artif Organs** 2007; 31: 268-273.

CHEN F, OUYANG H, FENG X, GAO Z, YANG Y, ZOU X, LIU T, ZHAO G, MAO T. Anchoring Dental Implant in Tissue-Engineered Bone Using Composite Scaffold: A Preliminary Study in Nude Mouse Model. **J Oral Maxillofac Surg** 2005; 63: 586-591.

CHEN F, FENG X, WU W, OUYANG H, GAO Z, CHENG X, HOU R, MAO T. Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2007; 36: 822-827.

CICCONETTI A, SACCHETTI B, BARTOLI A, MICHIEZI S, CORSI A, FUNARI A, GEHRON-ROBEY P, BIANCO P, RIMINUCCI M. Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2007; 104: 618.e1-618.e12.

CLARKE AS, HOSKINS NL, JORDAN GR, MARSH DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. **Bone** 2007; 40: 939-947.

CONNOLY J, GUSE R, LIPPIELLO L, DEHNE R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J Bone Joint Surg Am** 1989; 71: 684-691.

CONNOLY J. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. **J Clin Orthop Res** 1998; 355: 257-266.

CUMMINE J, ARMSTRONG L, NADE S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. Studies of cellular behaviour using combined myelo-osseous grafts in the subscorbutic guinea pig. **Acta Orthop Scand** 1983; 54: 235-241.

DÉGANO IR, VILALTA M, BAGÓ JR, MATTHIES AM, HUBBELL JA, DIMITRIOU H, BIANCO P, RUBIO N, BLANCO J. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials** 2008; 29: 427-437.

DEVLIN H, SLOAN P. Early bone healing events in the human extraction socket. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2002, 31: 641-645.

DOI K, KUBO T, HAYASHI K, IMURA K, AKAGAWA Y. Development of cell-hybrid artificial bone: effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. **Dent Mater J** 2007; 26: 162-169.

DUALIBI SE, DUALIBI MT, ZHANG W, ASRICAN R, VACANTI JP, YELICK PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. **J Dent Res** 2008; 87: 745-750.

FLEMING Jr JE, CORNELL CN, MUSCHLER GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. **Orthop Clin North Am** 2000, 31: 357-374.

FICKL S, ZUHR O, WACHTEL H, BOLZ W, HUERZELER MB. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. **Clin Oral Impl Res** 2008; 19: 1111-1118.

FIORELLINI JP, HOWELL TH, COCHRAN D, MALMQUIST J, LILLY LC, SPAGNOLI D, TOLJANIC J, JONES A, NEVINS M. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. **J Periodontol** 2005; 76: 605-613.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVE AI, FROLOVA GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation** 1968; 6: 230-247.

FROUM S, CHO SC, ROSENBERG E, ROHRER M, TARNOW D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. **J Periodontol** 2002; 73: 94-102.

GEBHART M, LANE J. A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. **Acta Orthop Belg** 1991; 57: 130-143.

GEIGER F, LORENZ H, XU W, SZALAY K, KASTEN P, CLAES L, AUGAT P, RICHTER W. VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. **Bone** 2007; 41: 516-522.

GIANNONI P, MASTROGIACOMO M, ALINI M, PEARCE SG, CORSI A, SANTOLINI F, MURAGLIA A, BIANCO P, CANCEDDA R. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. **J Tissue Eng Regen Med** 2008; 2: 253-262.

GOUJON E. Recherches experimentales sue les proprietes. **J Anat** 1869; 6: 399-412.

GRAY JC, ELVES MW. Early osteogenesis in compact bone isografts: a quantitative study of contributions of the different graft cells. **Calcif Tissue Int** 1979; 29: 225-237.

GRAY JC, ELVES MW. Donor cells' contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts. **Clin Orthop** 1982; 163: 261-271.

GRUNDEL RE, CHAPMAN MW, YEE T, MOORE DC. Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. **Clin Orthop** 1991; 266: 244-258.

GUPTA D, KHANNA S, TULI SM. Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. An experimental study. **Int Orthop** 1982; 6: 79-85.

GUREVITCH O, KURKALLI BGS, PRIGOZHINA T, KASIR J, GAFT A, SLAVIN S. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. **Stem cells** 2003; 21: 588-597.

HAMANISHI C, YOSHII T, TOTANI Y, TANAKA S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. **Clin Orthop Relat Res** 1994; 303: 250-255.

HASEGAWA N, KAWAGUCHI H, HIRACHI A, TAKEDA K, MIZUNO N, NISHIMURA M, KOIKE C, TSUJI K, IBA H, KATO Y, KURIHARA H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. **J Periodontol** 2006; 77: 1003-1007.

HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood** 2003; 102: 3483-3493.

IASELLA JM, GREENWELL H, MILLER RL, HILL M, DRISKO C, BOHRA AA, SCHEETZ JP. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. **J Periodontol** 2003;74:990-999.

JACKSON IT, SCHEKER LR, VANDERVORD JG, Mc LENNAN JG. Bone marrow grafting in the secondary closure of alveolar-palatal defects in children. **Br J Plast Surg** 1981; 34: 422-425.

JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature** 2002; 418: 41-49.

JIANG X, ZHAO J, WANG S, SUN X, ZHANG X, CHEN J, KAPLAN DL, ZHANG Z. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. **Biomaterials** 2009; 5 [Epub ahead of print].

JOHNSON K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla after tooth extraction. Part 1: Normal healing. **Aust Den J** 1963;8:428-434.

JOHNSON K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla after tooth extraction. **Aust Dent J** 1969;14:241-244.

KADIYALA S, YOUNG RG, THIEDE MA, BRUDER SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant** 1997; 6: 125-134.

KAIGLER D, KREBSBACH PH, POLVERINI PJ, MOONEY DJ. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. **Tissue Eng** 2003; 9: 95-103.

KALE S, LONG MW. Osteopoiesis the early development of bone cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr** 2000; New York, N.Y., 10: 259-271.

KASTEN P, VOGEL J, LUGINBUHL R, NIEMEYER P, WEISS S, SCHNEIDER S, KRAMER M, LEO A, RICHTER W. Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. **Cells Tissues Organs** 2006; 183: 68-79.

KAWAGUCHI H, HIRACHI A, HASEGAWA N, IWATA T, HAMAGUCHI H, SHIBA H, TAKATA T, KATO Y, KURIHARA H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. **J Periodontol** 2004; 75: 1281-1287.

KOK IJ, DRAPEAU SJ, YOUNG R, COOPER LF. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2005; 20: 511-518.

KON E, MURAGLIA A, CORSI A, BIANCO A, MARCACCI M, MARTIN I, BOYDE A, RUSPANTINI I, CHISTOLINI P, ROCCA M, GIARDINO R, CANCEDDA R, QUARTO R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. **J Biomed Mater Res** 2000; 49: 328-337.

KORBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair – A new therapeutic concept? **N Engl J Med** 2003; 349: 570-582.

KOTOBUKI N, HIROSE M, MACHIDA H, KATOU Y, MURAKI K, TAKAKURA Y, OHGUSHI H. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. **Tissue Eng** 2005; 11: 663-673.

KREBSBACH PH, ROBEY PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. **J Dent Educ** 2002; 66: 766-773.

KRZYMANSKI G, KALCZAK M, WIKTOR-JEDRZEJCZAL W. The use of bone marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1997; 26: 55-60.

LANE JM, YASKO AW, TOMIN E, COLE BJ, WALLER S, BROWNE M, TUREK T, GROSS J. Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. **Clin Orthop** 1999; 361: 216-227.

LEKOVIC V, CAMARGO PM, KLOKKEVOLD PR, WEINLAENDER M, KENNEY EB, DIMITRIJEVIC B, NEDIC M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. **J Periodontol** 1998; 69: 1044-1049.

LEKOVIC V, KENNEY EB, WEINLAENDER M, HAN T, KLOKKEVOLD PR, NEDIC M, et al. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. **J Periodontol** 1997; 68: 563-70.

LEMOLI RM, BERTOLINI F, CANCEDDA R, De LUCA M, Del SANTO A, FERRARI G, FERRARI S, MARTINO G, MAVILIO F, TURA S. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? **Haematologica** 2005; 90: 360-381.

LEONARDI E, DEVESCOVI V, PERUT F, CIAPETTI G, GIUNTI A. Isolation, characterisation and osteogenic potential of human bone marrow stromal cells derived from the medullary cavity of the femur. **Chir Organi Mov** 2008; 92: 97-103.

LO NN, NG R, SONG IC, TAN SK. Effect of growth hormone on bone marrow grafts in fracture healing – An experimental study in rabbits. **Ann Acad Med Singapore** 1995; 24: 343-346.

LUCARELLI E, DONATI D, CENACCHI A, FORNASARI PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfus Apher Sci** 2004; 30: 169-174.

LUCARELLI E, FINI M, BECCHERONI A, GIAVARESI G, Di BELLA C, ALDINI NN, GUZZARDELLA G, MARTINI L, CENACCHI A, Di MAGGIO N, SANGIORGI L, FORNASARI PM, MERCURI M, GIARDINO R, DONATI D. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Clin Orthop Relat Res** 2005; 435: 62-68.

MATIN K, NAKAMURA H, IRIE K, OZAWA H, EJIRI S. Impact of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on residual ridge resorption after tooth extraction: An experimental study in the rat. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2001; 16: 400-411.

MAREI MK, NOUH SR, SAAD MM, ISMAIL NS. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants. **Tissue Eng** 2005; 11: 751-767.

MARTIN I, MURAGLIA A, CAMPANILE G, CANCEDDA R, QUARTO R. Fibroblast Growth Factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. **Endocrinology** 1997; 138: 4456-4462.

MECALL RA, ROSENFELD AL. Influence of residual ridge resorption patterns on fixture placement and tooth position, Part III: Presurgical assessment of ridge augmentation requirements. **Int J Periodontics Restorative Dent** 1996; 16: 323-327.

MISCH CM. Ridge augmentation using mandibular ramus bone grafts for the placement of dental implants: Presentation of a technique. **Pract Periodontics Aesthet Dent** 1996; 8: 127-135.

MUSCHLER GF, BOEHM C, EASLEY K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **J Bone Joint Surg Am** 1997; 79: 1699-1709.

MUSCHLER GF, NITTO H, BOEHM CA, EASLEY KA. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **J Orthop Res** 2001; 19: 117-125.

MUSCHLER GF, MIDURA RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop** 2002; 395: 66-80.

NADE S. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. II. The initial cellular events following transplantation of decalcified allografts of cancellous bone. **Acta Orthop Scand** 1977; 48: 572-579.

OHGUSHI H, GOLDBERG, CAPLAN AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. **Acta Orthop Scand** 1989; 60: 334-339.

PALEY D, YOUNG MC, WILEY AM, FORNASIER VL, JACKSON RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. **Clin Orthop Relat Res** 1986; 208: 300-312.

PAOLANTONIO M, DOLCI M, SCARANO A. Immediate implant placement in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. **J Periodontol** 2001; 72(11): 1560-1571.

PETITE H, VIATEAU V, BENSAID W, MEUNIER A, de POLLACK C, BOURGUIGNON M, OUDINA K, SEDEL L, GUILLEMIN G. Tissue-engineered bone regeneration. **Nat Biotechnol** 2000; 18: 959-963.

PIERI F, LUCARELLI E, CORINALDESI G, FINI M, ALDINI NN, GIARDINO R, DONATI D, MARCHETTI C. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. **J Oral Maxillofac Surg** 2009; 67: 265-272.

PLENK Jr H, HOLLMANN K, WILFERT KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of Kiel bone containing fresh autologous marrow. **J Bone Joint Surg Br** 1972; 54: 735-743.

POLIZZI G, GRUNDER U, GOENÉ R, HATANO N, HENRY P, JACKSON WJ, et al. Immediate and delayed implant placement into extraction sockets: A 5-year report. **Clin Implant Dent Relat Res** 2000;2:93-99.

QI M, HU J, ZOU S, ZHOU H, HAN L. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats. **J Craniomaxillofac Surg** 2006; 34: 283-289.

QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, KUTEPOV SM, MUKHACHEV V, LAVROUKOV A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **N Engl J Med** 2001; 344: 385-386.

ROSENQUIST B, GREENTHE B. Immediate placement of implants into extraction sockets: Implant survival. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1996;11:205-209.

SCHLIEPHAKE H, KNEBEL JW, AUFDERHEIDE M, TAUSCHER M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2001; 30: 531-537.

SCHROPP L, KOSTOPOULOS L, WENZEL A. Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2003;18:189-199.

SCHROPP L, WENZEL A, KOSTOPOULOS L, KARRING T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2003; 23: 313-323.

SEIBERT JS, LINDHE J. Estética no tratamento periodontal. *In* LINDHE J. Tratado de Periodontia e Implantodontia Oral. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 1999, pp 463-491.

SEIBERT JS. Reconstruction of the partially edentulous ridge: gateway to improved prosthetics and superior aesthetics. **Pract Periodontics Aesthet Dent** 1993; 5: 47-55.

SHARMA S, GARG NK, VELIATH AJ, SUBRAMANIAN S, SRIVASTAVA KK. Percutaneous bone-marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. **Acta Orthop Scand** 1992; 63: 166-169.

SHAYESTEH YS, KHOJASTEH A, SOLEIMANI M, ALIKHASI M, KHOSHZABAN A, AHMADBEIGI N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a β -tricalcium phosphate/hydroxiapatite scaffold. **Oral Surg Oral Med**

Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 106: 203-209.

SHI B, ZHOU Y, WANG YN, CHENG XR. Alveolar ridge preservation prior to implant placement with surgical-grade calcium sulfate and platelet-rich plasma: A pilot study in a canine model. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2007;22:656-665.

SLACK JMW. Stem cells in epithelial tissues. **Science** 2000; 287: 1431-1433.

SMILER D, SOLTAN M. Bone marrow aspiration: technique, grafts, and reports. **Implant Dent** 2006; 15: 229-235.

SMILER D, SOLTAN M, LEE JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. **Implant Dent** 2007; 16: 42 -53.

SMILER D, SOLTAN M, ALBITAR M. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. **Implant Dent** 2008; 17: 236-247.

SMUKLER H, LANDI L, SETAYESH R. Histomorphometric evaluation of extraction sockets and deficient alveolar ridges treated with allograft and barrier membrane: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1999; 14: 407-416.

SOLTAN M, SMILER D, PRASAD HS, ROHRER MD. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. **Implant Dent** 2007; 16: 329-339.

TAKAGI K, URIST MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. **Clin Orthop** 1982; 171: 224-231.

TAKAHASHI T, FUKUDA M, YAMAGUCHI T, KOCHI S. Placement of endosseous implants into bone-grafted alveolar clefts: assessment of bone bridge after autogenous particulate cancellous bone and marrow graft. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1999; 14: 86-93.

TALLGREN A. The continuing reduction of the residual alveolar bone ridge in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. **J Prosthet Dent** 1972; 27: 120-132.

TANG Y, TANG W, LIN Y, LONG J, WANG H, LIU L, TIAN W. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats. **Cell Biol Int** 2008; 32: 1150-1157.

TIEDEMAN JJ, CONNOLLY JF, STRATES BS, LIPPIELLO L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. **Clin Orthop Relat Res** 1991; 268: 294-303.

TORIGOE I, SOTOME S, TSUCHIYA A, YOSHII T, MAEHARA H, SUGATA Y, ICHINOSE S, SHINOMIYA K, OKAWA A. Bone regeneration with autologous plasma, bone marrow stromal cells, and porous β -tricalcium phosphate in nonhuman primates. **Tissue Eng Part A** 2009; 1-11 [Epub ahead of print].

TU QISHENG, VALVERDE P, LI S, ZHANG J, YANG P, CHEN J. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. **Tissue Eng** 2007; 13: 2431-2440.

TURGEMAN G, PITTMAN DD. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. **J Gene Med** 2001; 3: 240-251.

VADALÀ G, Di MARTINO A, TIRINDELLI MC, DENARO L, DENARO V. Use of autologous bone marrow cells concentrate enriched with platelet-rich fibrin on corticocancellous bone allograft for posterolateral multilevel cervical fusion. **J Tissue Eng Regen Med** 2008; 2: 515-520.

WARRER L, GOTFREDSEN K, HJORTING-HANSEN E, KARRING T. Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental implants placed into

extraction sockets. An experimental study in monkeys. **Clin Oral Implants Res** 1991; 2: 166-71.

WILSON TG, WEBER HP. Classification of and therapy for areas of deficient bony housing prior to dental implant placement. **Int J Periodontics Restorative Dent** 1993;13:451-459.

WOLFF D, GOLDBERG VM, STEVENSON S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. **J Orthop Res** 1994; 12: 439-446.

YAMADA Y, UEDA M, NAIKI T, NAGASAKA T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. **Clin Oral Impl Res** 2004; 15: 589-597.

YAMADA Y, NAKAMURA S, ITO K, KOHGO T, HIBI H, NAGASAKA T, UEDA M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6- year follow-up. **Tissue Eng Part A** 2008; 10: 1699-1707.

YAMAMOTO N, FURUYA K, HANADA K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvara: model for in vitro bone formation. **Biol Pharm Bull** 2002; 25: 509-555.

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, portador(a) do RG de número _____, autorizo o Cirurgião Dentista *André Antonio Pelegrine*, pertencente à equipe odontológica do Hemocentro/Unicamp, a realizar em mim a remoção do(s) dente(s) comprometido(s). Estou ciente da possibilidade de ser efetuada remoção de uma pequena quantidade do “tutano” (medula óssea) do osso da minha bacia (ilíaco) para que seja colocado na cavidade que continha o dente. Sei que em um grupo de pacientes somente será efetuada a remoção dos dentes e que em outro será feito, além desta remoção, a inserção do material proveniente da minha medula óssea. Tenho plena consciência de que isto será decidido mediante a execução de um sorteio que será realizado previamente pelos pesquisadores.

Estou ciente também de que, no grupo de pacientes em que será realizado a remoção da medula óssea, será feito inicialmente uma anestesia local, com auxílio de uma seringa descartável.

Após a remoção do(s) dente(s), independentemente da colocação ou não do material da medula óssea, será instalada um “micro parafuso de titânio”, internamente, no local onde o dente estava posicionado, para servir como ponto de referência pelos pesquisadores com relação às avaliações futuras.

Fui informado(a) de que, após um período aproximado de 06 meses, será instalado um “pino de titânio” (implante dental) dentro do osso, no local onde foi feita a remoção do dente. Este implante será instalado mediante a execução de uma anestesia local, semelhante a executada para remoção do dente. Após a instalação do(s) implante(s) será(ão) confeccionada(s) prótese(s) sobre o mesmo para repor a coroa do dente perdido. Sei da necessidade de meu retorno mensal durante todo o período do tratamento proposto.

Todas as dúvidas relativas a esses procedimentos foram esclarecidas no momento da assinatura deste. Esses procedimentos serão realizados sem qualquer ônus para mim. Serei informado sobre os resultados dos exames coletados, sendo mantido sigilo e caráter confidencial sobre a minha identidade quando do momento da exposição das conclusões e da publicação do projeto. Terei acesso, pelos meios abaixo, a contato com os pesquisadores quando assim o desejar.

Autorizo a execução de fotografias da minha boca durante a execução dos procedimentos clínicos. Fica facultada a minha desistência da participação desta pesquisa a qualquer momento que me convir.

Campinas, de _____ de 2008.

Assinatura/RG – Paciente ou responsável legal

Testemunhas: 1- _____ 2- _____

Nome do Cirurgião Dentista: André Antonio Pelegrine – CROSP 61927

Nome da responsável pelo ambulatório: Maria Elvira Correa – CROSP 35606

Anexo 2 – Parecer do comitê de ética em pesquisa da Universidade de Campinas – UNICAMP



CEP, 01/12/05.
(Grupo III)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 677/2005

CAAE: 1612.0.146.776-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “REPARO DE ALVÉOLOS DENTAIIS FRESCOS COM O USO DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: André Antonio Pelegrine

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/Unicamp

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/11/05

II - OBJETIVOS

Avaliação da segurança e eficácia da utilização do implante de medula óssea em alvéolos frescos de pacientes submetidos a procedimentos de exodontia de pelo menos um elemento dental anteriores superiores, no que se refere à promoção de osteogênese.

III - SUMÁRIO

Estudo clínico aberto, coorte, controlado, randomizado e paralelo em 20 indivíduos que apresentem necessidade de exodontia de pelo menos um elemento dental do grupo dos anteriores superiores. Os pacientes serão divididos em dois grupos: remoção do dente e colocação de placa de titânio (ponto de referência) apenas e no outro além deste procedimento será realizada a punção de medula óssea (crista ilíaca) e enxerto no local do dente extraído, seguida de mensurações de avaliação do alvéolo dentário. Os grupos serão divididos por sorteio. Os voluntários serão reavaliados mensalmente por seis meses. Ao final do estudo os sítios serão reabertos pela mesma técnica cirúrgica e serão realizadas as mensurações clínicas como na fase inicial. Em seguida será realizada a placa de titânio e serão instalados implantes osseointegráveis. Após 6 meses do implante se iniciará a fase protética sobre os pinos já osteointegrados. As mensurações serão comparadas com teste "t" de Student. Critérios de inclusão exclusão adequados.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas as pendências, projeto adequado em termos éticos.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2005.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 3 – Aceite do periódico *qualis A*

12-Nov-2009

Dear Prof. Pelegrine:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft" in its current form for publication in Clinical Oral Implants Research. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to sign a Copyright Transfer Agreement (CTA) Form if and when the manuscript is ACCEPTED for publication.

A CTA Form has to be duly completed (including manuscript identification number) on behalf of all co-authors. Please scan the completed form and send it electronically to the Production Editor at

clr@oxon.blackwellpublishing.com or fax it to +65 6295 6202.

Alternatively, you can send it to:

Production Editor
Journal Content Management
Wiley-Blackwell
Wiley Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road
#05-01 Parkview Square
Singapore 188778

An article will not proceed in production before the CTA form has been received at the Production office.

The CTA Form can be downloaded at
<http://www.wiley.com/go/ctaaglobal>.

As part of the Journal's continued commitment to its authors, the Editorial Office and Publisher wish to keep you informed about what will happen next and, as the attached paper contains important information regarding journal publication and services for authors, you may wish to save it for future reference.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Clinical Oral Implants Research, we look

forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Niklaus Lang

Editor in Chief, Clinical Oral Implants Research

nplang@dial.eunet.ch

Referee(s)' Comments to Author: None