

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO OSTEOCUTÂNEO
PRÉ-FABRICADO COM UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM CARREADOR DE OSSO LIOFILIZADO**

VICTOR VIEIRA ORSI

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre,
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

VICTOR VIEIRA ORSI

**MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO OSTEOCUTÂNEO
PRÉ-FABRICADO COM UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM CARREADOR DE OSSO LIOFILIZADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares

Co-orientadora: Dra. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre
2006

DEDICATÓRIA

A meus pais, Álvaro e Sueli.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a ajuda de diversas pessoas às quais presto homenagem e agradeço:

Ao meu orientador Dr. Marcus Vinícius Martins Collares pela orientação, oportunidades e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Nance Nardi pelo apoio e orientação, e por propiciar o convívio com os pesquisadores no Laboratório de Imunogenética do Instituto de Biociências da UFRGS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED da UFRGS, seus professores e funcionários pelo aprendizado e pela atenção dispensada a cada um dos seus alunos.

Ao Professor Rinaldo De Angeli Pinto, pela oportunidade de participar das atividades do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo incentivo ao crescimento profissional, e pelo exemplo como professor e como médico.

Ao Dr. Lindolfo Meirelles pelo exemplo de competência profissional, pela colaboração nas etapas realizadas no Laboratório de Imunogenética, e pela disponibilidade em discutir os detalhes técnicos do projeto.

À Dra. Luíse Meurer pelo interesse e colaboração, não apenas nas análises histológicas, mas também na discussão de idéias para o projeto desde a sua fase inicial.

À Professora Carmen Pilla pela colaboração e disponibilidade de desenvolver protocolos de análises bioquímicas específicos para a realização deste projeto, dentro da Unidade de Pesquisas Biomédicas do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Dr. Carlos Roberto Galia pelo exemplo de espírito empreendedor, graças ao qual hoje podemos contar com o Banco de Tecidos do Hospital de Clínicas de Porto

AGRADECIMENTOS

Alegre, pelo incentivo constante para a realização de pesquisas com materiais de substituição óssea, e pelo apoio e colaboração na obtenção de materiais para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Ricardo Rosito, pelo interesse na discussão de aspectos metodológicos do projeto, pela colaboração nos experimentos, e pela ajuda na obtenção de materiais utilizados nesta pesquisa.

Ao Dr. Luís Alberto dos Santos pelo interesse e disponibilidade para discutir sobre biomateriais e materiais de substituição óssea, e pela colaboração e incentivo para dar continuidade e ampliar a atual linha de pesquisa.

Ao Dr. Ciro Paz Portinho, que me antecedeu como aluno desta pós-graduação, e foi o principal idealizador da linha de pesquisa na qual segui trabalhando, pelo exemplo de capacidade criativa e empreendedora, e pelas contribuições e colaborações em todas as etapas do trabalho.

À Professora Roseli de Oliveira Möllerke, Chefe do Centro de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do HCPA, e aos técnicos Eduardo Mottola Amaro da Silveira e Marcos Eugênio Soares Duarte, pela colaboração e pelo exemplo de trabalho cuidadoso e ético em pesquisa envolvendo animais.

À biomédica Márcia Riboldi e à acadêmica de biomedicina Tais Bauer Auler pela colaboração nas etapas experimentais do trabalho e no aperfeiçoamento de protocolos laboratoriais, e pelo seu trabalho com competência e responsabilidade nas etapas mais complexas do projeto.

Ao Dr. Murilo Foppa pela contribuição e disponibilidade para discutir aspectos relacionados à análise dos resultados.

Ao meu irmão Ricardo Vieira Orsi pelo auxílio na revisão gramatical dos textos.

À doutoranda Karin Sumino e ao acadêmico de Medicina Gustavo Morellato pela colaboração na fase de revisão da literatura e discussão de idéias para o projeto.

À técnica de patologia Neiva Copetti pela dedicação em seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Rosane Paixão Schlatter e Fabiana Silva da Silva pela atenção com que atendem a cada aluno e trabalham para tornar viável cada um dos projetos de pesquisa.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA pela colaboração na análise do projeto sob o ponto de vista científico e bioético, e pela colaboração na análise estatística dos dados .

Aos órgãos de apoio à pesquisa - CAPES e FIPE - pelo financiamento ao projeto.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo experimental de retalho osteocutâneo pré-fabricado, composto pelo implante e pele sobrejacente, baseado em vasos provenientes da axila, com arco de rotação suficientemente longo para alcançar zonas de perdas ósseas cranianas.28
- Figura 2 - Retalho osteocutâneo pré-fabricado transferido com sucesso para cobrir falha óssea craniana.28
- Figura 3 - Blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado com 8X8x2mm, imersos no meio de cultura contendo as diferentes linhagens celulares, de acordo com o grupo de comparação.....30
- Figura 4 - Retirada do implante com margem de tecidos moles adjacentes.33
- Figura 5 - Cortes histológicos dos construtos ósseos, 5 semanas após a implantação em sítio subcutâneo no dorso. Aumento 50x,coloração HE. a) Grupo 1 - OL controle; b) Grupo2 - OL + CMM; c) Grupo3 – OL + CTM; d) Grupo4 –OL +CTMdif.36

RESUMO

Introdução: A engenharia tecidual óssea com utilização de células-tronco mesenquimais é um campo de pesquisas com potencial para aplicação clínica em cirurgia plástica reparadora. Suas vantagens seriam ampliar as opções de reconstrução e diminuir a morbidade cirúrgica nas zonas doadoras. Não está definida na literatura médica a possibilidade de utilizar o osso liofilizado bovino não-desmineralizado como estrutura tridimensional e carreadora celular para engenharia tecidual óssea.

Objetivo: Avaliar o uso de células da medula óssea, com potencial osteogênico, agregadas a estrutura tridimensional de osso liofilizado bovino não-desmineralizado para engenharia tecidual óssea, em modelo experimental heterotópico.

Materiais e Métodos: Os animais doadores de células da medula óssea, assim como os animais receptores dos construtos ósseos, foram camundongos de linhagem isogênica C57Bl/6. Os construtos ósseos consistiram em osso liofilizado bovino não-desmineralizado (OL) associado a diferentes grupos celulares com potencial osteogênico, e foram implantados no plano subcutâneo no dorso dos animais, em procedimento cirúrgico compatível com a primeira etapa da confecção de retalho osteocutâneo pré-fabricado. Grupos de comparação (n=10 em cada grupo): 1) OL isoladamente (controle); 2) OL + células mononucleares da medula; 3) OL + células-tronco mesenquimais; 4) OL + células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteoindutor. A aferição foi realizada após 5 semanas, com avaliação histológica e determinação da atividade de fosfatase alcalina.

Resultados: A avaliação histológica não mostrou diferença entre os grupos de comparação. Em todas as amostras observou-se processo inflamatório crônico, com nítida reabsorção óssea, e com tecido conjuntivo fibroso circunjacente ao implante estendendo-se por entre as trabéculas ósseas. Não foram visualizados osteoblastos ou osteócitos viáveis, nem neoformação óssea, em nenhum dos cortes histológicos examinados. Os resultados da atividade de fosfatase alcalina também não mostraram diferença entre os grupos de comparação, com análise de variância entre grupos mostrando $p=0,867$.

Discussão: No modelo estudado, a adição de células da medula óssea com potencial osteogênico sobre estrutura de osso liofilizado bovino não-desmineralizado não agregou propriedades osteogênicas ao material. Com isso, não se confirmou a perspectiva inicial de utilizá-lo como estrutura tridimensional e carreadora celular na engenharia tecidual óssea em sítio heterotópico. Para melhor definir o papel deste material, sugerem-se estudos subseqüentes que o avaliem em outros modelos experimentais, comparando com outros materiais de uso já estabelecido, e explorando separadamente cada etapa metodológica que possa influir no sucesso da engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave:

Células-tronco mesenquimais; Engenharia tecidual; Osso liofilizado.

ABSTRACT

Introduction: Bone tissue engineering using mesenchymal stem cells is a research area with potential applicability in reconstructive plastic surgery, aiming to broaden surgical choices and decrease morbidity in donor sites. It has not been established in the medical literature whether bovine non-demineralized lyophilized bone can be used as a scaffold and cell carrier for bone tissue engineering.

Objective: To assess the use of bone marrow cells with osteogenic potential seeded on a bovine non-demineralized lyophilized bone scaffold for bone tissue engineering in a heterotopic experimental model.

Materials and Methods: The donors of bone marrow cells, as well as the receptors of the osseous constructs were isogenic line C57Bl/6 mice. The constructs consisted on bovine non-demineralized lyophilized bone (LB) with addition of different cell groups with osteogenic potential, and they were implanted into subcutaneous sites on the backs of the animals in a surgical procedure compatible with an osteocutaneous flap pre-fabrication. Comparison groups (n=10 each group): 1) LB alone (control group); 2) LB + marrow mononuclear cells 3) LB + mesenchymal stem cells; 4) LB + mesenchymal stem cells differentiated in an osteoinductive medium. The constructs were harvested at 5 weeks after implantation for histological analysis and alkaline phosphatase activity test.

Results: The histological analysis did not show differences among the comparison groups. In all samples, chronic inflammatory process was observed, with evident osseous resorption, and with adjacent fibrous connective tissue rich in neovessels extending through bone trabeculae. Viable osteoblasts or osteocytes, as well as new bone formation, were not observed. Likewise, results of the alkaline phosphatase activity test have not shown any difference among comparison groups, with analysis of variance between groups showing p value=0.867.

Discussion: In this experimental model, the addition of bone marrow cells with osteogenic potential to a bovine non-demineralized lyophilized bone scaffold did not add osteogenic properties to the material. Therefore, the initial perspective of using it as a scaffold for bone tissue engineering in heterotopic sites could not be confirmed. In order to better define the role of this material, further studies should be conducted, assessing it in other experimental models, comparing it with other materials currently in use and separately exploring each methodological step that might influence the success of bone tissue engineering.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Tissue engineering; Lyophilized bone.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	PRÉ-MOLDAGEM DE RETALHOS	12
1.2	ENGENHARIA DE TECIDOS (ET)	13
1.3	ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA	14
1.4	ENXERTOS ÓSSEOS E OSSO LIOFILIZADO.....	15
1.5	MATERIAIS DE SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA.....	20
1.6	BIOCOMPATIBILIDADE E BIOFUNCIONALIDADE	21
1.7	OSSO BOVINO LIOFILIZADO NÃO-DESMINERALIZADO COMO BIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA	22
1.8	DADOS ESTATÍSTICOS	23
1.9	ASPECTOS BIOÉTICOS E A LEGISLAÇÃO VIGENTE SOBRE PESQUISA COM CÉLULAS-TRONCO	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	DELINEAMENTO.....	27
3.2	ANIMAIS	27
3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO PRÉ-FABRICADO COM COMPONENTE ÓSSEO	27
3.4	GRUPOS DE COMPARAÇÃO.....	29
3.5	PREPARO DOS BLOCOS DE OSSO LIOFILIZADO.....	29
3.6	CULTIVO CELULAR.....	31
3.7	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: IMPLANTE SUBCUTÂNEO NO DORSO	32
3.8	AFERIÇÃO	32
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	42
7	REFERÊNCIAS	43
8	ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS - OSSO LIOFILIZADO BOVINO NÃO- DESMINERALIZADO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA ENGENHARIA TECIDUAL - ESTUDO EXPERIMENTAL EM SÍTIO HETEROTÓPICO	50
	RESUMO	50
	1INTRODUÇÃO	51
	2MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
	2.1 ANIMAIS.....	52
	2.2 PREPARO DOS BLOCOS DE OSSO LIOFILIZADO	53
	2.3 CULTIVO CELULAR	54
	2.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE IMPLANTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	55
	2.5 AFERIÇÃO	55
	2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56

SUMÁRIO

3	RESULTADOS	57
4	DISCUSSÃO	59
	REFERÊNCIAS	64
9	ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS: BOVINE NON-DEMINERALIZED LYOPHILIZED BONE WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FOR TISSUE ENGINEERING: EXPERIMENTAL STUDY IN HETEROTOPIC SITE	68
	ABSTRACT	68
1	INTRODUCTION	68
2	MATERIALS AND METHODS	70
2.1	ANIMALS	70
2.2	PREPARATION OF THE LYOPHILIZED BONE BLOCKS	70
2.3	CELL CULTURE	71
2.4	SURGICAL PROCEDURE FOR THE <i>IN VIVO</i> IMPLANTATION	73
2.5	HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS	73
2.6	STATISTICAL ANALYSIS	74
3	RESULTS	74
4	DISCUSSION	76
	REFERENCES	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRÉ-MOLDAGEM DE RETALHOS

Perdas craniomaxilofaciais envolvendo estruturas ósseas e tecidos moles podem ocorrer como resultado de ressecções tumorais, defeitos congênitos ou condições traumáticas. Em alguns casos, a reconstrução das estruturas tridimensionais complexas da face exige a transferência de retalhos contendo tecido ósseo vascularizado^(1,2). Esses retalhos (osteocutâneos ou osteomiocutâneos) apresentam características importantes para a reconstrução craniomaxilofacial, pois ao serem transferidos com sua vascularização intrínseca preservada, mantêm o potencial osteogênico e a capacidade de integração óssea, mesmo em áreas receptoras com vascularização prejudicada por tecido cicatricial ou radioterapia⁽²⁾.

Entretanto, a utilização de retalhos com componente ósseo está sujeita a limitações técnicas e acarreta dano inevitável às áreas doadoras^(2,3). Os retalhos com componente ósseo disponíveis são poucos e nem sempre apresentam características físicas ideais para se conformar a um dado defeito. A dificuldade provém do fato de que, enquanto os defeitos podem ter inúmeras formas diferentes, os retalhos são limitados pela anatomia vascular local, o que freqüentemente os torna inadequados em termos de forma, volume, espessura e orientação espacial de seus componentes⁽³⁾. Exemplos típicos desse cenário clínico são os defeitos oromandibulares, onde os retalhos osteocutâneos ou osteomiocutâneos disponíveis nem sempre alcançam adequadamente as necessidades reconstrutivas do caso.

As dificuldades descritas justificam os esforços despendidos em estudos experimentais e o número crescente de relatos clínicos sobre **pré-fabricação ou pré-moldagem de retalhos**. A pré-fabricação de retalhos tem por princípio obter, antes da transferência, todos os elementos teciduais necessários em um carreador vascular confiável. Assim, pode-se criar estruturas complexas, com forma, volume e orientação espacial adequados, que de outro modo não estariam prontamente disponíveis para reconstrução⁽⁵⁾. Os métodos utilizados para pré-fabricação de retalhos seguem princípios bem estabelecidos em cirurgia plástica: indução vascular pela transferência em estágios, autonomização, expansão tecidual, enxertias, inclusão de materiais haloplásticos, ou, mais recentemente, a **engenharia de tecidos**. A utilização da engenharia de tecidos para obtenção do tecido ósseo a ser

incorporado em retalhos pré-moldados é um campo de pesquisas atual e promissor, pois pode ampliar as possibilidades reconstrutivas, com menor morbidade nas zonas doadoras ^(1,4,5).

1.2 ENGENHARIA DE TECIDOS (ET)

Musschler et al.⁽⁶⁾ definiram a engenharia de tecidos como o conjunto de métodos e esforços para criar ou induzir a formação de tecidos específicos em um local específico, através da seleção e manipulação de células, matrizes e estímulos biológicos. Segundo esse autor, a ET envolve fundamentalmente duas etapas, independentes ou associadas: (1) a manipulação *ex vivo* de células do próprio paciente, sua expansão, diferenciação e integração potencial em estruturas superiores, que serão reintroduzidas nas regiões lesadas e integradas no processo de regeneração (**bioengenharia ou engenharia de tecidos** propriamente dita); e (2) a introdução nas regiões lesadas de estruturas supramoleculares semelhantes aos elementos da matriz extracelular e mediadores intercelulares associados, facilitando a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas, fomentando o reparo de lesões ou a regeneração e renovação de tecidos degenerados (**biomimética**).

Nos últimos anos, o conceito do uso da célula tronco-progenitora de origem embrionária introduziu novas perspectivas no tratamento celular de patologias teciduais. A possibilidade de cultivo de células progenitoras embrionárias (*embryonic stem cells – ESC*) humanas a partir de blastocistos obtidos por fecundação *in vitro*, permitiu propor transplantes de células embrionárias totipotentes em tecidos degenerados, conseguindo uma regeneração *in situ* de populações celulares funcionais. Existe uma via alternativa ao uso de células embrionárias, visto que **o organismo adulto possui uma reserva de células-tronco-progenitoras pluripotentes**⁽⁶⁾. A fonte mais ampla é aparentemente a medula óssea, cujas células-tronco mostram capacidade de diferenciação praticamente totipotente, incluindo (em modelos animais) a diferenciação em uma ampla gama de células de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica. Como essas células podem ser facilmente coletadas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, esse novo conceito abre amplas possibilidades de uso em medicina regenerativa, em sistemas autólogos e, portanto, **isentos de problema de rejeição imunológica**.

Além das células progenitoras medulares, vários tecidos guardam a reserva interna de células pouco diferenciadas com capacidade de regeneração. As células satélites das fibras musculares esqueléticas são um dos exemplos clássicos, assim como os pericitos pericapilares. Estudos recentes mostram que, embora engajadas em uma via ou em um número limitado de vias de diferenciação (*committed stem cells*), essas células podem ser induzidas em transdiferenciação, como por exemplo na obtenção de condroblastos e osteoblastos a partir de células satélites musculares ou de pré-adipócitos⁽⁶⁾. Essas observações estabelecem uma perspectiva para a medicina regenerativa, cujos limites têm se mostrado a cada dia mais amplos.

1.3 ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

As células estromais de medula óssea contêm Células-Tronco Mesenquimais (CTM), que são consideradas multipotentes, capazes de originar diferentes linhagens mesenquimais: **osteoblastos**, condrócitos, adipócitos e miócitos. Diversos autores têm demonstrado o potencial das CTM em reconstituir tecido ósseo em modelos experimentais *in vivo* ⁽⁷⁻¹⁰⁾. Essas células também podem ser cultivadas e diferenciadas *ex vivo*, utilizando meios osteoindutores, para serem reimplantadas com finalidade de reconstituir tecido ósseo ^(11,12).

A agregação dessas células a uma superfície mineralizada, como cerâmicas porosas, parece favorecer a formação de tecido ósseo primário ^(4,13-16). Boo et al. ⁽¹⁹⁾ em estudo que utiliza modelo experimental de engenharia tecidual óssea *in vivo* em ratos, de implante subcutâneo de células-tronco mesenquimais carregadas em estrutura tridimensional de β -tricalciofosfato e hidroxiapatita, mostraram na histologia e análise bioquímica que já na primeira semana após a implantação existem osteoblastos sobre a superfície mineralizada. Nesse estudo, os níveis de fosfatase alcalina, indicadora de atividade osteoblástica, alcançaram valores máximos 2 (duas) semanas após o implante, enquanto os níveis de osteocalcina, indicadora de diferenciação óssea, foram crescentes até a oitava semana. Em modelo experimental semelhante, Kim et al. ⁽²⁰⁾ comparam diferentes materiais: cerâmica de β -tricalciofosfato e estruturas absorvíveis de colágeno, para servir como carreadores de proteínas morfogenéticas ósseas, as BMPs. Nesse estudo, se demonstrou a presença de osteoblastos aderidos à superfície da estrutura carreadora na segunda semana após a implantação subcutânea, com ambos os materiais. Entretanto, a

quantidade de osso neoformado e a remodelação óssea foram superiores com o carreador de β -tricalciofosfato (β -TCP).

Diversos estudos sobre biomateriais na engenharia tecidual óssea ressaltam a importância da **composição** e da **microestrutura porosa** do material utilizado⁽¹⁹⁻²⁴⁾. Alam⁽²¹⁾ compara cerâmicas com diferentes proporções de HA e β -TCP: desde 100% HA, 75/25, 50/50, 25/75 até 100% β -TCP, em modelo experimental *in vivo*, heterotópico, de engenharia tecidual com BMPs; e nesse estudo os melhores resultados foram obtidos com maiores proporções de HA. Habibovich⁽²²⁾, em estudo sobre as propriedades estruturais das cerâmicas de HA e β -TCP, avaliou materiais com diferentes microporosidades, obtidos variando a temperatura de síntese de 1150 a 1250°C (quanto maior a temperatura de síntese da cerâmica menor o tamanho dos microporos). Esse trabalho resalta a importância dos **microporos**, que devem ter pelo menos 10 μ m de diâmetro, para permitir a adesão celular à superfície mineralizada. Mas o autor também lembra que o material deve ter **macroporos** interligados, que permitam a neovascularização do implante. Ele utiliza a expressão “microporos dentro das paredes dos macroporos”, para descrever a estrutura tridimensional necessária para obter neoformação óssea no modelo utilizado. Okamoto⁽²³⁾, em modelo de engenharia tecidual óssea *in vivo* com implantes heterotópicos, comparou cerâmicas de hidroxiapatita (HA) com 3 diferentes graus de macroporosidade: 30, 50 e 70%, e mostrou que a neoformação óssea ocorre já na primeira semana com o material mais poroso (70%), enquanto com o material menos poroso (30%), tais achados só estavam presentes na quarta semana.

Os estudos citados acima demonstram a importância da composição e da estrutura tridimensional do material utilizado para engenharia tecidual óssea, que deve ao mesmo tempo permitir a integração e neovascularização do implante, e favorecer a adesão celular à superfície de suas paredes.

1.4 ENXERTOS ÓSSEOS E OSSO LIOFILIZADO

Enquanto a engenharia tecidual óssea representa uma área promissora de pesquisa aplicada, com utilização clínica ainda restrita a protocolos experimentais, o uso de enxertos ósseos é um recurso amplamente utilizado, com relatos de uso bem sucedido desde há mais de três séculos^(25,26). A base científica dos enxertos ósseos

foi estabelecida em meados do século XIX, com as observações feitas por Ollier, em 1867, sobre as propriedades osteogênicas do osso e perióstio⁽²⁷⁾. Os conceitos básicos da cicatrização e integração de enxertos ósseos foram formulados ainda no final do século XIX por Barth, que demonstrou que a remoção do osso necrótico ocorreria simultaneamente com o depósito do novo osso, denominando este processo de “*creeping substitution*”⁽²⁸⁾. A publicação de Parrish em 1966 é, sem dúvida, a contribuição clínica mais importante para o armazenamento ósseo, mostrando que os ossos armazenados em bancos por períodos longos e utilizados em cirurgias de substituição nos tumores ósseos foram subsequenteiramente substituídos e incorporados pelo hospedeiro^(29,30). A compreensão da fisiologia dos enxertos ósseos pelos conceitos introduzidos por Urist⁽³¹⁾, colaborou muito para que sua utilização proporcionasse bons resultados. Com a descoberta de que os eventos celulares responsáveis pelo desenvolvimento embriológico do tecido ósseo e pela cicatrização de fraturas eram reproduzíveis seqüencialmente quando enxertos desmineralizados eram colocados no espaço subcutâneo ou submuscular em ratos, passou-se a questionar a possibilidade de existir uma participação ativa do enxerto no processo cicatricial. Demonstrou-se então que a neoformação óssea envolvia interações entre células mesenquimais do hospedeiro e proteínas presentes no enxerto, chamadas posteriormente de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), levando a diferenciação dessas células em osteoblastos⁽³¹⁻³³⁾.

Os materiais de enxertia óssea podem ser divididos grosseiramente em **auto-enxertos**, **homoenxertos** e **xenoenxertos**⁽³³⁾. Os autoenxertos, ou enxertos autólogos, são aqueles retirados e implantados no mesmo indivíduo. Embora somente uma pequena fração das células transplantadas sobreviva, elas contribuem significativamente para melhorar o processo de integração óssea, atribuindo ao material propriedades osteogênicas. O uso dos enxertos autólogos, além de promover neoformação óssea por osteogênese, osteoindução e osteocondução, elimina o risco de reações imunológicas, mas, quando se considera a morbidade associada à sua obtenção, oferece menos vantagens sobre os outros tipos de enxertos⁽³³⁾. Os enxertos homólogos ou homoenxertos são, por definição, retirados de um indivíduo e implantados em outro da mesma espécie, portanto espera-se que provoque uma reação imunológica do receptor contra suas células. Sendo assim, os homoenxertos são preparados e processados para remover as células e reduzir essa reação imune. A remoção eficaz dos restos celulares também diminui o risco

de transmissão de partículas virais intracelulares. Na ausência de células viáveis, os enxertos homólogos não promovem osteogênese como ocorre nos auto-enxertos, e suas propriedades osteoindutivas e osteocondutivas variam dependendo do método de processamento empregado. Os xenoenxertos, que são transplantes entre espécies diferentes, produzem uma reação intensa do hospedeiro. Quando são desproteinizados e desengordurados mostram uma resposta imune reduzida, mas esse processo também destrói a capacidade osteoindutiva do implante da matriz óssea e, por esse motivo, podem ser considerados menos efetivos ⁽³³⁾.

O tecido ósseo é imunogênico e os elementos celulares são os maiores responsáveis pelos problemas de histocompatibilidade. Os antígenos do tecido ósseo não diferem dos de outros tecidos, e neste caso estão associados às células nucleadas da medula óssea ^(33,34). Os antígenos mais comumente associados a transplantes de órgãos são os antígenos HLA classes I e II relacionados às células do enxerto. Eles estimulam anticorpos celulares que destroem as células proliferativas e a matriz, enquanto o componente inorgânico não produz resposta imunológica ⁽³³⁻³⁶⁾. Apesar disso, em alguns experimentos, a remoção das células da medula óssea não eliminou a resposta imunológica mediada pelos linfócitos T. Devido à sua maior antigenicidade ⁽³⁵⁾, e também devido ao risco de transmissão de doenças infecciosas, o osso não-autólogo fresco tem encontrado pouca utilização clínica.

Portanto, a utilização de homoenxertos ou xenoenxertos costuma ser precedida de métodos de preparação que diminuam sua antigenicidade, diminuam o risco de transmissão de doenças e facilitem seu armazenamento. Uma das formas de preparo e armazenamento de enxertos ósseos é a congelação profunda - uma técnica simples em que o osso é retirado estéril e processado por congelamento em temperaturas que oscilam de -20°C até -170°C ^(35,37). A maior vantagem desse método é a sua simplicidade, necessitando de poucos recursos físicos. Entretanto, a congelação não elimina a antigenicidade nem o risco de transmissão de doenças do enxerto, não propiciando a inativação de muitos vírus e bactérias, principalmente esporos ^(35,38,39).

A **liofilização** (desidratação a frio) tem sido utilizada nos últimos 50 anos, tornando-se um dos métodos de preservação de osso e tecido colágeno de resultados mais satisfatórios ⁽⁴⁰⁾. A liofilização, por outro lado, requer um processo complexo e só está disponível nos centros com maior avanço tecnológico ^(29,41,42). A

técnica consiste no resfriamento a -70°C do osso previamente desengordurado. Em seguida, o material é colocado em um liofilizador - aparelho que forma um vácuo enquanto a temperatura é mantida a -40°C , retirando-se até 95% da água. A realização desse procedimento exige o liofilizador a frio, uma centrífuga para grandes volumes, um agitador, espaço físico apropriado e os reagentes químicos, o que aumenta os investimentos iniciais ⁽⁴⁰⁾. Suas vantagens são a diminuição marcada da antigenicidade do enxerto, o menor risco de transmissão de doenças, a praticidade do armazenamento e manuseio transoperatório e a mínima alteração bioquímica. Após a liofilização, o tecido pode ser armazenado a temperatura ambiente por longos períodos e transportado facilmente ^(38,40,45-47). Devido à diminuição na antigenicidade do enxerto, a incorporação do osso liofilizado parece ser superior a do congelado ^(40,69).

Cabe diferenciar as propriedades dos enxertos ósseos liofilizados mineralizados e desmineralizados: Marinak ⁽⁷³⁾ avaliou o potencial osteoindutivo de xenoenxerto ósseo liofilizado desmineralizado em modelo experimental com sítio de implantação heterotópico (subcutâneo), comparando com osso liofilizado mineralizado e blocos de hidroxapatita. O autor demonstrou ocorrer neoformação óssea somente no osso liofilizado desmineralizado. A capacidade osteoindutiva desse material embasa o seu uso corrente nas cirurgias ortopédicas e maxilofaciais, e acredita-se que sua habilidade em induzir neoformação óssea quando implantado em sítio heterotópico está relacionada à presença e difusão das BMPs presentes na matriz óssea ^(48,49). Por outro lado, os ossos liofilizados **não-desmineralizados** não se mostraram osteoindutivos quando implantados heterotopicamente em modelos animais ⁽⁷³⁾, e quando implantados ortotopicamente atuaram apenas como matriz osteocondutiva ⁽⁴⁹⁾. Apesar destas observações, alguns trabalhos descrevem os enxertos liofilizados **não-desmineralizados** como osteoindutivos, visto que também neste material tem-se isolado fatores de crescimento, incluindo as BMPs ⁽⁵⁰⁾. Sabe-se que a idade do doador é um fator capaz de influir na capacidade osteoindutiva dos transplantes ósseos liofilizados ^(48,51), motivo pelo qual vários bancos de tecidos descartam doadores acima de 55 anos.

A liofilização pode alterar significativamente a biomecânica dos enxertos se utilizados como implantes estruturais. Alguns estudos sugerem que a força de torção e a elasticidade diminuem com o processo. Outros autores relatam que a liofilização aumenta a rigidez e a resistência à compressão do enxerto ^(25,47). Alguns autores

sugerem a reidratação do enxerto liofilizado, visando restaurar as propriedades ósseas alteradas, porém esse aspecto permanece controverso⁽⁵³⁾. Em estudos desenvolvidos com a colaboração do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não se encontrou diferenças significativas entre enxertos liofilizados e congelados em relação à compressão e ao fator de deformação; além disso, o tempo de reidratação do enxerto liofilizado mostrou não desempenhar um papel significativo, sugerindo não haver a necessidade de reidratação antes do ato cirúrgico⁽³⁸⁾. Outros autores relatam que o processamento pode, inclusive, aumentar a resistência mecânica do osso processado⁽²⁷⁾.

Em qualquer transplante de tecido de um indivíduo para outro existe o risco de transmissão coincidente de doenças infecciosas^(35,39,54). Em contraste com os demais órgãos, os tecidos colágenos e ósseos não-autólogos são preferencialmente não-viáveis no momento do transplante, e, portanto, os métodos de armazenamento e esterilização desses enxertos não exigem a preservação das células. Mesmo considerando as medidas de seleção dos doadores, o risco de agentes infecciosos estarem presentes no tecido obtido não pode ser negligenciado e um método factível e seguro para uma esterilização secundária sem danos ao tecido certamente deve ser procurado⁽⁴⁰⁾. As propriedades osteoindutivas dos enxertos podem ser afetadas pelos vários métodos de esterilização. Fatores como custo e segurança relacionados aos implantes ósseos processados levam à procura de novas alternativas biologicamente benignas para a esterilização. O procedimento ideal para esterilizar os enxertos ósseos deveria ser efetivo contra uma grande variedade de microorganismos infecciosos e também preservar as propriedades mecânicas e biológicas do tecido⁽⁵⁹⁾. Os métodos de esterilização secundária do osso incluem a utilização de produtos químicos como óxido de etileno, radiação gama, e autoclavagem^(35,40,55,59-61,75).

Uma zona receptora saudável é extremamente importante para o sucesso da enxertia óssea^(32,62-66). Os transplantes ósseos variam da profunda dependência do meio receptor de um homoenxerto ou xenoenxerto até a quase autonomia dos retalhos vascularizados com componente ósseo. Quanto menos ativo biologicamente e mais dependente do meio for o enxerto, melhor condição deverá ter o leito receptor^(33,67). Observa-se que tanto a reabsorção quanto a neoformação óssea não ocorrem antes da revascularização do enxerto⁽⁶²⁾. Não interessa se

proveniente do enxerto ou do receptor, a neoformação óssea ocorrerá de modo muito discreto sem vascularização abundante.

1.5 MATERIAIS DE SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA

As definições de enxerto ósseo e material de substituição óssea podem causar confusão. Pensa-se num enxerto ou transplante como a transferência de um tecido ou órgão contendo células que devem sobreviver no sítio receptor, enquanto o material de substituição óssea é geralmente considerado um implante de material não viável⁽³³⁾. Os homoenxertos e xenoenxertos são diferentes da maioria dos transplantes de órgãos sólidos, porque neles as células são removidas intencionalmente para minimizar a resposta imunológica. Dessa maneira, um enxerto homólogo ou xenólogo em que a remoção das células foi feita de maneira eficiente poderia ser definido como um implante de material de substituição óssea. O uso de materiais aloplásticos representa uma alternativa que visa a disponibilizar material sem a morbidade da obtenção de osso autógeno, e sem o risco de transmissão de doenças do doador para o receptor.

Segundo Sailer⁽⁷⁰⁾ um material de substituição óssea deve alcançar os seguintes requisitos:

- estimular a regeneração e a consolidação óssea;
- proporcionar resistência fisiológica;
- propiciar uma resistência funcional a longo prazo;
- permanecer observável (ter contraste radiográfico);
- ser obtido prontamente;
- ser fácil de usar;
- não causar reação inflamatória em tecidos adjacentes;
- não levar a encapsulação de tecido conjuntivo;
- não iniciar transformação maligna;
- não produzir subprodutos tóxicos;
- não ter quaisquer propriedades galvânicas ou eletrolíticas;
- não proporcionar nenhum mecanismo de transferência para infecções.

O uso da engenharia tecidual com células-tronco busca agregar qualidade a esse material, conferindo-lhe potencial osteogênico. É importante levar em conta os conceitos de **osteocondução**, **osteoidução** e **osteogênese**^(35,67): na

osteocondução, o implante colocado na zona de perda óssea (ortotópico) serve de suporte para a adesão e crescimento de células ósseas do receptor, oferecendo estrutura para depósito ósseo. Na osteoindução o material é capaz de promover a formação de novo tecido ósseo pelo recrutamento ativo das células mesenquimais do receptor, que se diferenciarão em osteoblastos mediante a ação de mediadores intercelulares, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento. Materiais com esta propriedade, portanto, podem induzir crescimento ósseo mesmo quando implantados em sítios heterotópicos. E a osteogênese é a síntese óssea por células sobreviventes no implante.

Para avaliar essas propriedades fundamentais de um material de substituição óssea (MSO) é importante avaliar diferenciadamente o seu comportamento quando implantados em **zona de perda óssea (ortotópico)** ou em **zona sem contato ósseo (heterotópico)**. Os modelos heterotópicos permitem avaliar as propriedades do material sem a interação com o meio de lesão óssea, e sem células provenientes de osso adjacente, permitindo assim evidenciar se o material tem propriedades osteoindutivas e osteogênicas, ou somente osteocondutivas.

1.6 BIOCOMPATIBILIDADE E BIOFUNCIONALIDADE

Biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízos ao organismo a curto e longo prazos. Dentro desse conceito, para que um material seja aceito clinicamente como um material de implante, ele precisa atender a alguns requisitos fundamentais:

- a presença do material não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- os tecidos não devem causar a degradação do material, como, por exemplo, corrosão em metais, a não ser de forma tolerável;
- o material deve ser esterilizável e isento de risco de transmissão de doenças infecciosas.

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Essas qualidades são representadas pelo conceito de biofuncionalidade (Ravaglioli, 1992)⁽⁷¹⁾. Nesse conceito estão

incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

1.7 OSSO BOVINO LIOFILIZADO NÃO-DESMINERALIZADO COMO BIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

As qualidades de biocompatibilidade e biofuncionalidade dos enxertos ósseos liofilizados não-desmineralizados de origem bovina, assim como a disponibilidade e o fácil armazenamento do material, são características que favorecem a utilização clínica desse material. Os estudos de Galia⁽⁵²⁾, desenvolvidos em linha de pesquisa neste Programa de Pós-graduação, ajudaram a difundir seu uso no nosso meio, na área da ortopedia. Dentro dessa mesma linha de pesquisa, Oliveira⁽⁸³⁾ estudou, em modelos experimentais, as qualidades desse material para uso em cirurgias reparadoras craniomaxilofaciais.

O processo de liofilização, ao eliminar a celularidade e parte dos componentes orgânicos do enxerto ósseo, diminui drasticamente a sua imunogenicidade^(35,68), o que o torna um arcabouço osteocondutor com boa capacidade de integração no sítio receptor. Essas características nos motivaram a explorar a possibilidade de utilizar esse material como estrutura tridimensional carreadora de células-tronco mesenquimais para a engenharia tecidual óssea. Diversos estudos demonstram que as células-tronco mesenquimais são eficazes em conferir propriedades osteogênicas a determinados materiais carreadores, especialmente as cerâmicas porosas de hidroxiapatita ou tricalciofosfato^(4,13-16,19-24).

Um dos poucos trabalhos na literatura sobre engenharia tecidual com células-tronco mesenquimais que utiliza matrizes ósseas mineralizadas como arcabouço tridimensional foi desenvolvido por Mauney⁽⁷³⁾. Esse autor utiliza xenoenxertos ósseos bovinos submetidos a desengorduramento e diferentes graus de desmineralização (sem liofilização), em modelo de implante heterotópico, e avalia se ocorre neoformação óssea. Seus estudos demonstram a presença de neoformação óssea, sem diferença significativa entre o material não-desmineralizado, parcialmente desmineralizado ou totalmente desmineralizado. Entretanto, existem diferenças importantes nos métodos de preparo dos xenoenxertos utilizados por

Mauney et al. e o processo de liofilização utilizado no nosso meio, o que impede a generalização dos resultados.

Não há, dessa forma, informações na literatura que definam o papel do osso liofilizado bovino não-desmineralizado na engenharia tecidual óssea. A presente linha de pesquisa, com os trabalhos de Portinho et al.^(79,82), sob orientação do Dr. Marcus Vinícius Martins Collares, explora essa possibilidade em modelos experimentais em camundongos. Portinho testou os construtos ósseos compostos por osso liofilizado bovino não-desmineralizado com ou sem a adição de células-tronco mesenquimais, para tratamento de falhas ósseas cranianas – sítio ortotópico. Os resultados iniciais⁽⁸²⁾ mostram superioridade na neoformação óssea quando se adiciona ao construto ósseo o componente celular. Esses resultados nos motivam a seguir estudando o osso liofilizado bovino não-desmineralizado e seu papel como estrutura tridimensional carreadora de células-tronco mesenquimais.

1.8 DADOS ESTATÍSTICOS

As inovações conceituais e tecnológicas representam o trilha central do desenvolvimento da engenharia de tecidos (ET). Nos EUA, mais de 90% dos investimentos nessa área, que somaram, na década de 90, mais de 3 bilhões de dólares, com crescimento para valor superior a 1,5 bilhão de dólares no biênio 2000/2001, são oriundos da área industrial privada. No entanto, a análise do perfil de investimentos mostra que a área industrial privada investe essencialmente em processos já estabelecidos. Cinco das maiores companhias norte-americanas de ET têm como produto principal os substitutos de pele. Com vistas a corrigir essa falta de visão prospectiva, as agências públicas federais dos EUA estão aumentando os seus esforços, tendo investido na mesma década 83,2 milhões de dólares, dos quais 19,3 milhões em 2000.

No Brasil, a demanda para os procedimentos médicos de ET origina-se tanto na área privada quanto em centros médicos públicos. Para a rede privada, representa a possibilidade de oferecer um tratamento de alta complexidade a um público qualificado, com poder aquisitivo compatível com o alto custo, e habituado a despesas com tratamento e prevenção médica. Para a rede pública, a demanda origina-se na obrigação de atender e tratar patologias complexas e lesões graves,

que geram para a sociedade um custo extremamente elevado. Embora exista o interesse da rede privada nessa área, sua capacidade de investimento é limitada.

1.9 ASPECTOS BIOÉTICOS E A LEGISLAÇÃO VIGENTE SOBRE PESQUISA COM CÉLULAS-TRONCO

A utilização de células-tronco, particularmente as de origem embrionária, tem gerado divergências no campo da Bioética e do Direito. Até recentemente a legislação brasileira, conforme a Instrução Normativa 08/97 proibia a manipulação genética de células germinais ou totipotentes. Dessa forma, qualquer pesquisa com utilização de células-tronco, independente de ser de origem embrionária ou de indivíduos adultos, ficava restrita a modelos experimentais. Entretanto, com a aprovação da Lei da Biossegurança – Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, abriu-se a possibilidade de manipulação de células totipotentes com fins terapêuticos em seres humanos. A Lei de Biossegurança, em seu artigo 5º, permite a utilização de células-tronco **embrionárias** para fins de pesquisa e terapia, desde que obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados no respectivo procedimento, e atendidas as seguintes condições: a) que sejam provenientes de embriões inviáveis; b) que os embriões estejam congelados há 3 (três) anos ou mais; c) que haja o consentimento dos genitores; d) que se restrinja a instituições que realizem pesquisa ou terapia com células-tronco embrionárias humanas seguindo projetos aprovados pelos respectivos comitês de ética em pesquisa; e e) proibida a comercialização desse material biológico.

A Lei de Biossegurança tem sofrido críticas pela comunidade científica por diversos motivos, em especial, pela forma desordenada com que agrupou assuntos totalmente diversos⁽⁷²⁾. Essa lei regulamenta a produção e comercialização de produtos geneticamente modificados, a utilização e pesquisa com células-tronco humanas, assuntos relativos a técnicas de reprodução humana assistida, e, por fim, a estruturação e definição de papéis de órgãos de controle como a CTNbio e a Comissão Nacional de Biossegurança. Além disso, a Lei da Biossegurança sofre críticas por tratar assuntos importantes de forma excessivamente sintética, por utilizar termos pouco específicos e por estabelecer algumas exigências que, na prática, podem ser inadequadas.

Ainda que haja falhas na regulamentação, motivo pelo qual é alvo de críticas da comunidade científica, a atual legislação, nos termos da Lei da Biossegurança, permite a pesquisa e a utilização de células-tronco humanas com fins terapêuticos, e isso abre a possibilidade de aplicação clínica de técnicas de engenharia tecidual. A aprovação da atual legislação, portanto, pode ser vista como estímulo para incrementar as pesquisas com essa tecnologia.

As atividades deste projeto restringem-se ao modelo experimental em camundongos, e as células-tronco em estudo são obtidas da medula óssea de animais **adultos**; ainda assim, as considerações éticas e legais são relevantes, pois são determinantes para uma futura aplicabilidade clínica de tecnologias em desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar o uso de células-tronco mesenquimais em estrutura tridimensional de osso liofilizado para engenharia tecidual óssea, em modelo heterotópico compatível com primeira etapa de pré-moldagem de retalho osteocutâneo.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar as propriedades osteogênicas de implantes heterotópicos de osso liofilizado *versus* osso liofilizado com células mononucleares da medula óssea, osso liofilizado com células-tronco mesenquimais, e osso liofilizado com células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteoindutor, no modelo referido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo experimental, aberto, comparado e prospectivo.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas adultas, de linhagem isogênica C57Bl/6, com idade de 2 meses. Foi realizado estudo piloto com 5 animais, para desenvolvimento do modelo experimental e ajuste dos métodos. Na realização dos experimentos comparativos, foi previsto o uso de 40 animais (10 para cada grupo de comparação). Os animais foram mantidos com alimentação *ad libitum* e controle de ciclo biológico de acordo com os horários da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO PRÉ-FABRICADO COM COMPONENTE ÓSSEO

O modelo experimental foi desenvolvido em estudo piloto, e consistiu na implantação de construtos ósseos no plano subcutâneo no dorso de camundongos, como primeira etapa cirúrgica na confecção de retalho pré-fabricado pediculado osteocutâneo. A localização do implante no dorso permite a posterior transferência do retalho osteocutâneo composto pelo implante e pele sobrejacente, baseado em vasos provenientes da axila, com arco de rotação suficientemente longo para alcançar zonas de perdas ósseas cranianas (Figura 1). A viabilidade desse retalho osteocutâneo pré-moldado, e sua transferência bem sucedida até o crânio foi realizada somente nos animais do grupo piloto, visando confirmar a adequação do modelo experimental (Figura 2). Os animais dos grupos de comparação foram submetidos somente ao procedimento cirúrgico de implantação do construto ósseo.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina e xilazina, em condições de assepsia, e em conformidade com as normas do Centro de Pesquisa do HCPA.



Figura 1 – Modelo experimental de retalho osteocutâneo pré-fabricado, composto pelo implante e pele sobrejacente, baseado em vasos provenientes da axila, com arco de rotação suficientemente longo para alcançar zonas de perdas ósseas cranianas.

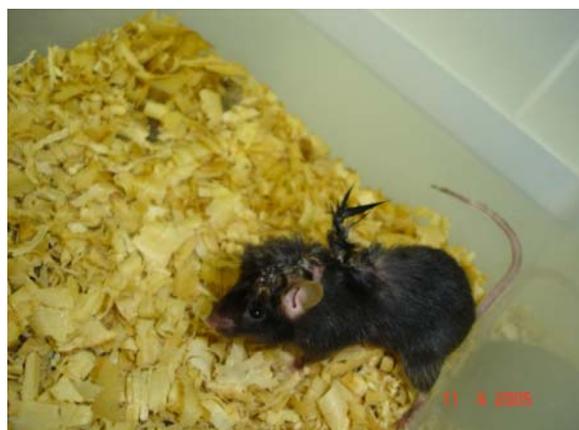


Figura 2 - Retalho osteocutâneo pré-fabricado transferido com sucesso para cobrir falha óssea craniana.

Observação: Os procedimentos ilustrados nas figuras 1 e 2 foram realizados somente em animais do grupo piloto, visando estabelecer o modelo experimental.

3.4 GRUPOS DE COMPARAÇÃO

Foram planejados 4 grupos de comparação, com 10 animais em cada grupo, e todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico de inserção de implante no plano subcutâneo no dorso. Os implantes consistiram em osso liofilizado (OL) associado a diferentes grupos celulares:

- Grupo 1: OL isoladamente (grupo controle)
- Grupo 2: OL + células mononucleares da medula (CMM)
- Grupo 3: OL + células-tronco mesenquimais (CTM)
- Grupo 4: OL + células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteoindutor (CTMdif)

3.5 PREPARO DOS BLOCOS DE OSSO LIOFILIZADO

Foi utilizado osso liofilizado (OL) não-desmineralizado de origem bovina. Como existe divergência na literatura sobre a propriedade osteoindutiva do osso liofilizado não-desmineralizado, e acredita-se que a idade do doador pode influir nessa propriedade^(48,51), tomou-se o cuidado de utilizar material proveniente do mesmo animal, ao longo de todo o projeto. Foi utilizada somente a porção medular da cabeça femoral, visando obter macroestrutura porosa homogênea, e a secção dos blocos, com dimensões de 8x8x2mm, foi realizada previamente ao processo de liofilização.

Seguiu-se o protocolo de liofilização do Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA, descrito abaixo:

- imersão por 1 hora em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %;
- lavagem em água filtrada a 4 °C;
- centrifugação a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos;
- desengorduramento em temperatura ambiente em uma solução de clorofórmio e metanol na diluição de 1:1. Durante este processo, a mistura de clorofórmio e metanol é continuamente agitada e trocada nas primeiras horas, e depois a cada hora de acordo com a sua coloração, permanecendo nesta mistura por 48 horas;

- centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos;
- aeração em contato direto com o meio ambiente por 24 horas para evaporação do metanol e do clorofórmio;
- lavagem e agitação em água filtrada a 4°C por 24 horas;
- centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos;
- liofilização a frio (-40°C) durante 7 dias;
- empacotamento em embalagens gás permeáveis;
- esterilização em autoclave por 10 minutos a 121°C.

Tendo em vista a utilização do material para uso em contato com células em cultura, foi implantada uma modificação, visando evitar o risco de toxicidade celular: aumento no tempo de aeração para 14 dias, para eliminar resíduos de agentes desengordurantes voláteis. Antes de colocar os blocos em contato com as células, foram imersos no meio de cultura até haver estabilização do pH.

Nos grupos 2, 3 e 4, os blocos de OL, com pH estabilizado, foram imersos no meio de cultura contendo as diferentes linhagens celulares, por período variável dependendo do grupo de comparação (Figura 3).



Figura 3 – Blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado com 8X8x2mm, imersos no meio de cultura contendo as diferentes linhagens celulares, de acordo com o grupo de comparação.

3.6 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células da medula óssea de camundongos da linhagem isogênica C57Bl/6 – mesma linhagem dos animais receptores dos construtos ósseos. As etapas de obtenção das células da medula de ossos longos, separação e cultura das células plástico-aderentes, assim como a etapa de diferenciação osteogênica *in vitro*, foram realizadas no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS – com os métodos previamente descritos por Meirelles e cols., 2003⁽¹⁸⁾.

1) Nos construtos utilizados no Grupo 1 (grupo controle), os blocos de osso liofilizado (OL) **não** foram colocados em contato com células, previamente à implantação.

2) No Grupo 2, foram utilizadas células mononucleares obtidas da medula de ossos longos (CMM), conforme protocolo descrito por Meirelles e cols. ⁽¹⁸⁾, suspensas na concentração de 10^6 células viáveis por mililitro, e colocadas em contato com os blocos de OL por 24 horas previamente à implantação.

3) No Grupo 3, foram utilizadas células plástico-aderentes seguindo o protocolo descrito por Meirelles e cols. ⁽¹⁸⁾, **sem** indução em meio osteogênico. As células obtidas por esse processo têm as seguintes características: mostram-se capazes de ser expandidas *in vitro* por mais de 50 passagens; podem ser induzidas a diferenciação osteogênica ou adipogênica; e podem suportar o crescimento e a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas. Por esse motivo, são definidas operacionalmente como **Células-Tronco Mesenquimais (CTM)** ⁽¹⁸⁾. No estudo de Meirelles e cols., as células obtidas por esse método apresentaram marcadores de superfície CD44, CD49e, CD29 e Sca-1, e exibiam morfologia homogênea e característica. As CTM obtidas por esse método foram ressuspensas na concentração de 10^6 células viáveis por mililitro, e mantidas em contato com os blocos de OL por 24h previamente à implantação.

4) No Grupo 4, foram utilizadas Células-tronco Mesenquimais obtidas pelo método descrito acima, ressuspensas na mesma concentração, colocadas em contato com os blocos de OL, e posteriormente colocadas em meio osteogênico por 3 semanas (CTMdif). O meio osteogênico utilizado foi constituído do meio normal suplementado com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato, em

concentrações descritas abaixo e seguindo o protocolo descrito por Phinney e cols. (1999)⁽¹⁷⁾, modificado por Meirelles e cols. (2003)⁽¹⁸⁾:

- Meio Normal: meio DMEM + soro fetal bovino (FBS) a 10% + solução tampão HEPES
- Dexametasona 10^{-8} M
- Ácido ascórbico-2-fosfato - 5 μ g/ml
- β -glicerol fosfato 10 Mm

3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: IMPLANTE SUBCUTÂNEO NO DORSO

Conforme já foi referido, os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina e xilazina, em condições de assepsia, e em conformidade com as normas do Centro de Pesquisa do HCPA. O procedimento de implantação do construto ósseo inicia-se com a antisepsia, incisão no sentido vertical na linha média do dorso e dissecação no plano subcutâneo até a região infraescapular, sobre o músculo grande dorsal. O implante é inserido até local dissecado, afastado da incisão para diminuir o risco de extrusão ou contaminação a partir da ferida operatória. A incisão é suturada com mononylon 4-0.

3.8 AFERIÇÃO

Os animais foram sacrificados 5 semanas após o procedimento de implantação do construto ósseo, utilizando câmara de CO₂, conforme protocolo do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O implante foi retirado com uma margem de tecidos moles adjacentes (Figura 4), e foi seccionado em 2 fragmentos: para avaliação histológica e para determinação da atividade da fosfatase alcalina.



Figura 4 – Retirada do implante com margem de tecidos moles adjacentes.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA: Os espécimes foram enviados ao Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa do HCPA em solução de formalina a 10%, e foram realizados os seguintes processos: descalcificação em solução de ácido nítrico, inclusão em parafina, cortes histológicos escalonados (5 cortes por fragmento), coloração por hematoxilina-eosina. A avaliação histológica por microscopia óptica foi realizada por patologista cego com relação aos grupos em estudo, e utilizaram-se os seguintes critérios: a celularidade (presença, quantidade e localização de células ósseas dentro do bloco de osso liofilizado), e a presença de matriz óssea neoformada.

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA: A determinação da atividade da **fosfatase alcalina (FA)** foi realizada na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do HCPA. A FA é uma enzima que reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção do *turnover* ósseo ⁽⁷⁷⁾, e aumentando precoce e significativamente nas situações de regeneração óssea ou osteoneogênese ⁽⁷⁸⁾. Utilizou-se protocolo desenvolvido previamente para a dosagem de fosfatase alcalina em construtos ósseos ou materiais de substituição óssea desenvolvidos por engenharia tecidual, apresentado por Portinho e colaboradores ⁽⁸²⁾. Esse protocolo utiliza o kit Sera-Pak Plus[®]- marca registrada Bayer, baseado em determinação cinética onde a enzima promove o desdobramento do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol, com mensuração espectrofotométrica.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos valores obtidos nas dosagens bioquímicas consistiu em uma descrição dos escores média \pm desvio-padrão para cada grupo em estudo, e pela análise de variância (ANOVA) de variáveis paramétricas, com realização de testes de comparação múltipla pós-análise (SNK).

Considerou-se um valor $p \leq 0.05$ como significativo. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS versão 14, disponibilizado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

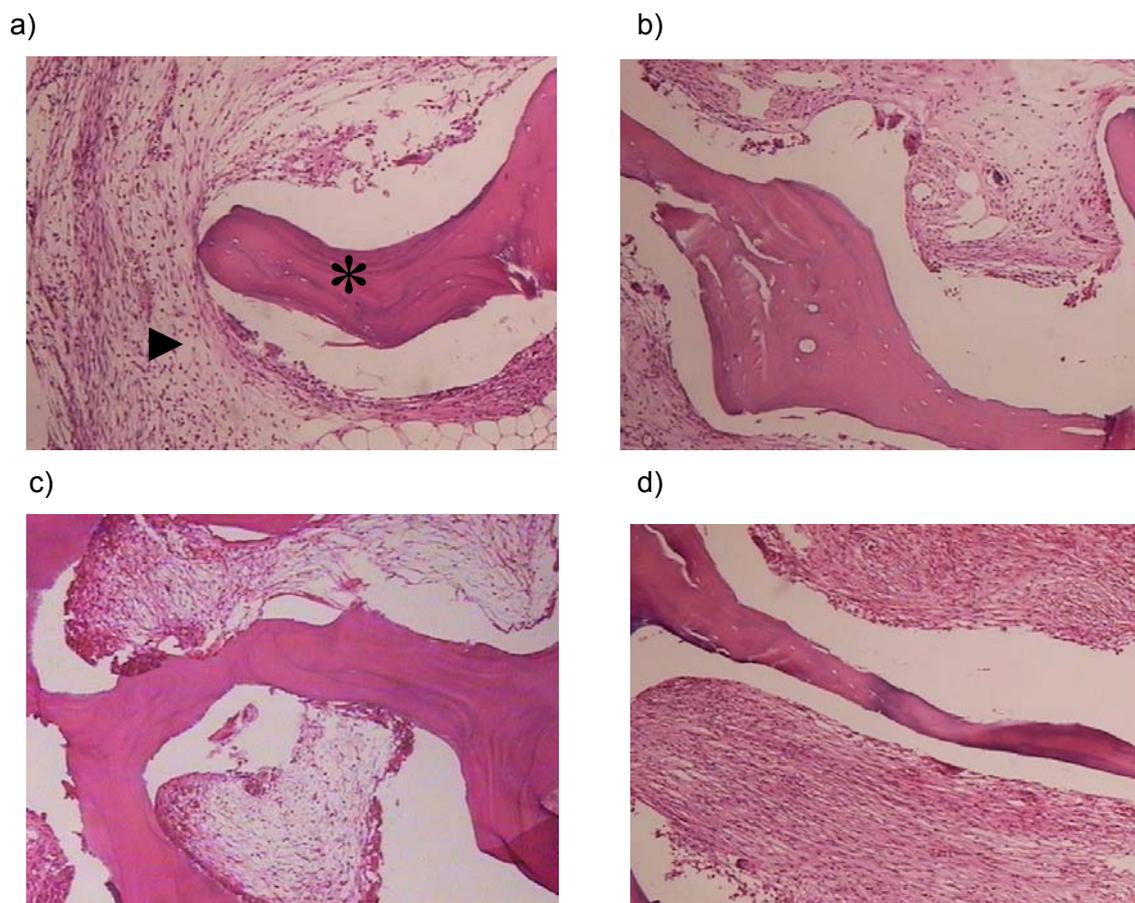
O projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4 RESULTADOS

Dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico de implantação do construto ósseo, foram eliminados aqueles em que houve extrusão do construto. Não houve outros motivos de perda.

O resultado qualitativo da avaliação histológica das amostras do Grupo 1 (OL sem adição de células) foi o seguinte: “Aos cortes histológicos, visualiza-se junto ao material implantado processo inflamatório crônico com nítida reabsorção incluindo células gigantes multinucleadas. O tecido conjuntivo circunjacente estende-se por entre as trabéculas ósseas como tecido fibroso rico em neovasos.” (Figura 5-a) Os resultados qualitativos da avaliação histológica das amostras do Grupo 2, 3 e 4 foram idênticos ao do Grupo 1, com aspecto histológico similar em todas as amostras avaliadas. Não se observou a presença de osteoblastos ou osteócitos, ou de neoformação óssea, em nenhuma das amostras avaliadas (Figura 5-b, 5-c e 5-d).

Os resultados da determinação da atividade de fosfatase alcalina (FA) são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de fosfatase alcalina entre os diferentes grupos de comparação, com análise de variância (ANOVA) entre grupos mostrando $p=0,867$.



- * trabécula óssea em reabsorção
- ◉ tecido fibroso com inflamação crônica

Figura 5 - Cortes histológicos dos construtos ósseos, 5 semanas após a implantação em sítio subcutâneo no dorso. Aumento 50x, coloração HE. a) Grupo 1 - OL controle; b) Grupo 2 - OL + CMM; c) Grupo 3 - OL + CTM; d) Grupo 4 - OL + CTMdif.

Tabela 1 – Atividade de fosfatase alcalina (FA)

GRUPO	N	Média	Desvio Padrão
1) OL (controle)	10	1,09	0,79
2) OL + CMM	10	1,04	0,81
3) OL + CTM	9	0,91	0,99
4) OL + CTMdif	10	0,79	0,83

ANOVA: $F=0,241$; $P=0,867$ (NS)

OL, osso liofilizado bovino não-desmineralizado; CMM, células mononucleares da medula; CTM, células-tronco mesenquimais; CTMdif, células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico

5 DISCUSSÃO

Neste estudo optou-se por um modelo experimental para avaliar construtos obtidos por engenharia tecidual óssea com células-tronco mesenquimais, implantados **em sítio heterotópico**. A implantação do construto ósseo em sítio heterotópico pode ser considerada a primeira etapa na pré-moldagem de retalho osteocutâneo, e a localização do implante nesse modelo é própria para uma posterior transferência como retalho pediculado para perdas teciduais no crânio. As principais características desse modelo foram escolhidas de forma a possibilitar a engenharia tecidual óssea e ao mesmo tempo favorecer o uso do modelo em estudos subseqüentes como retalho osteocutâneo pré-moldado. O sítio subcutâneo no dorso de camundongos ou ratos mostrou-se adequado para desenvolvimento de tecido ósseo utilizando células-tronco em carreadores tridimensionais de cerâmica de hidroxiapatita e fosfato de cálcio ^(14,19-24). Da mesma forma, optou-se por um período de seguimento após a implantação de 5 semanas, que tem se mostrado adequado em modelos similares ^(19,20,21,23).

A opção por estudar o **osso liofilizado bovino não-desmineralizado** como biomaterial para engenharia tecidual óssea leva em conta as suas qualidades favoráveis para uso clínico, disponibilidade e aceitação no nosso meio. O osso liofilizado não-desmineralizado tem papel bem estabelecido como material de substituição óssea, com características de biocompatibilidade e biofuncionalidade favoráveis em longo prazo ^(38,47,51,52). Apesar dessas características favoráveis, se contrapõe uma escassez de estudos utilizando esse material como estrutura tridimensional para engenharia tecidual óssea. O osso liofilizado não-desmineralizado é considerado um material osteocondutor, ainda que alguns autores considerem haver propriedades osteoindutivas, dependendo da idade do doador ^(48,51). Consideramos importante estudar se o acréscimo de células-tronco mesenquimais ao osso liofilizado é capaz de atribuir a esse material propriedades osteogênicas. O modelo em sítio heterotópico é adequado para definir se o material implantado tem propriedades osteoindutivas e/ou osteogênicas, ou apenas osteocondutivas.

As células agregadas aos implantes, nos grupos OL+ CMM (células mononucleares da medula), OL+ CTM (células-tronco mesenquimais) e OL+CTMdif (células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico) compreendem

diferentes fases de separação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, com potencial osteogênico. Considera-se que a frequência de células-tronco mesenquimais entre as células nucleadas da medula óssea é de 1:11.300 a 1:27.000⁽¹⁸⁾. Os métodos utilizados para obtenção de células da medula óssea dos camundongos isogênicos, separação celular, cultura de células-tronco mesenquimais, e sua diferenciação em meio osteogênico têm sido objeto de estudos prévios no Laboratório de Imunogenética da UFRGS, com resultados já publicados⁽¹⁸⁾. O objetivo de comparar células com potencial osteogênico em diferentes fases de separação e diferenciação foi verificar qual método obteria melhores resultados, com menor manipulação *ex vivo* possível.

A adesão das células da medula óssea ou das células-tronco mesenquimais ao material carreador é uma fase importante para o sucesso da engenharia tecidual óssea. Não há consenso na literatura sobre o método, a quantidade ou o período necessário de exposição das células ao construto para haver a adesão celular. Diferentes autores, em estudos bem-sucedidos de engenharia tecidual óssea com estruturas de cerâmicas de hidroxiapatita ou fosfato tricálcico^(14,19,23,24), utilizam métodos convencionais, similares ao utilizado neste estudo, em que se promove a suspensão das células no meio de cultura, e a seguir se permite sua sedimentação sobre os construtos. Os períodos de exposição das células aos construtos podem ser tão curtos quanto 2 (duas) horas, sem prejuízo para os resultados nesses estudos^(14,24). Mauney e cols.⁽⁷⁴⁾, em estudo que utiliza células-tronco da medula óssea humanas sobre estrutura de matriz óssea bovina desengordurada, utiliza período inicial de exposição das células ao construto de 12 horas; entretanto, esse autor utiliza um método que favorece a infiltração do meio entre os poros do construto, por meio de centrifugação em um biorreator desenvolvido com essa finalidade. O autor denomina esse método de “cultivo celular dinâmico” (“*dynamic cell seeding*”) e demonstra suas vantagens ao promover adesão celular mais homogênea e favorecer a sua infiltração dentro da matriz óssea^(74,80,81). Esses autores ressaltam a importância dessa fase da engenharia tecidual quando os construtos são grandes, um quesito fundamental para a aplicabilidade clínica. No estudo de Mauney e cols., que obteve sucesso na engenharia tecidual utilizando matrizes ósseas desengorduradas⁽⁷⁴⁾, os construtos tinham formato cilíndrico com 6mm de diâmetro por 3mm de espessura - dimensões comparáveis às dos blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado utilizados no presente estudo: 8x8x2mm.

A necessidade de utilizar métodos mais elaborados para promover a adesão celular nesses construtos é um dos aspectos metodológicos que pode ser questionado.

Os resultados da avaliação histológica 5 semanas após a implantação *in vivo* mostraram não haver neoformação óssea ou presença de osteoblastos nos implantes, em nenhum dos grupos de comparação. Os resultados da atividade de fosfatase alcalina (FA) mostraram não haver diferença significativa entre os grupos de comparação, com $p=0,867$; e os valores absolutos das mensurações nos 4 grupos de comparação podem ser considerados baixos: 0,959 em média. A FA é uma enzima que catalisa a hidrólise dos ésteres de fosfato em pH alcalino e parece ser um pré-requisito para a mineralização normal do esqueleto ⁽⁷⁸⁾. Segundo Yoshikawa (1999) ⁽⁷⁷⁾, a FA reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção do *turnover* ósseo. Entretanto, o osso não é a única fonte de FA no organismo, e isso pode levar a erros de aferição, a não ser que esta seja feita de maneira específica e proporcional a um órgão ou tecido, como, por exemplo, um enxerto ósseo. Nesse caso, a FA parece ser um sinal precoce da secreção osteoblástica de uma matriz, que se transformará subsequente em osso. Em estudos de engenharia tecidual óssea, a fosfatase alcalina é produzida por osteoblastos e por células-tronco mesenquimais desde o início de sua diferenciação óssea⁽¹⁴⁾, e apresenta estreita correlação com outros indicadores utilizados para a mesma finalidade, como a osteocalcina e a osteopontina ^(14,19,20).

Neste estudo, os resultados da histologia e da atividade de FA são concordantes no sentido de não haver atividade osteoblástica nas amostras avaliadas, em todos os grupos de comparação. Podemos, com isso, afirmar que a utilização de células mononucleares da medula (CMM), células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico (CTMdif) não conferiu ao osso liofilizado bovino não-desmineralizado propriedades osteogênicas, nesse modelo experimental e com os materiais e métodos utilizados. Entretanto, para uma visão mais esclarecedora sobre o papel do osso liofilizado não-desmineralizado na engenharia tecidual óssea, tornam-se necessários estudos específicos sobre cada etapa do processo.

Na engenharia tecidual óssea, a interação entre as células com potencial osteogênico e o material estrutural é um processo reconhecidamente complexo e ainda pouco compreendido ⁽¹⁵⁾. Conforme foi discutido previamente, alguns autores valorizam a utilização de métodos sofisticados de exposição das células aos

construtos, visando favorecer sua adesão *ex vivo* ^(74,80,81), e consideram essa etapa como fundamental para o sucesso da engenharia tecidual. Além da adesão celular inicial, é necessária uma interação com a superfície do material que favoreça o crescimento e diferenciação celular, e posteriormente a deposição de matriz óssea⁽¹⁵⁾. Alguns estudos com cerâmicas de hidroxiapatita demonstram que as características microestruturais do material podem influir no sucesso dessa interação^(22,23). Não existe informação na literatura sobre o processo de adesão e interação de células-tronco mesenquimais à superfície de osso liofilizado não-desmineralizado. O estudo de Mauney e cols. com matrizes ósseas bovinas desengorduradas (não-liofilizadas), desmineralizadas ou não-desmineralizadas⁽⁷⁴⁾, demonstra sucesso na agregação e diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais na fase *ex vivo*, e demonstra sucesso em obter neoformação óssea *in vivo* em 55% dos implantes. Esse estudo sustenta a possibilidade de utilizar matrizes ósseas bovinas como estrutura carreadora, mas os resultados não podem ser generalizados para o osso bovino liofilizado utilizado no presente estudo, devido às diferenças importantes no preparo do material ósseo e às diferenças na metodologia de exposição das células aos construtos.

Além da adequada interação célula-material, existem outros aspectos metodológicos que são importantes para obter sucesso na engenharia tecidual óssea. O procedimento cirúrgico de implantação e a integração do construto no sítio receptor também representam uma fase crítica para o sucesso da engenharia tecidual. Nessa fase, há risco importante de perda de células, mesmo que elas estejam adequadamente agregadas ao construto ósseo *ex vivo*. Sabe-se que mesmo nos enxertos autólogos, isentos de resposta imunológica, apenas uma pequena fração das células transplantadas irá permanecer viável após a enxertia^(33,76). O procedimento de enxertia/implantação desencadeia uma resposta que inclui a reação inflamatória ao trauma cirúrgico e a reação imune do hospedeiro ao implante, e a este processo segue-se a migração de células do hospedeiro e o início da neovascularização, resultando na formação de um estroma fibrovascular^(33,67). Todas as células utilizadas neste estudo, sendo obtidas de animais da mesma linhagem isogênica, podem ser consideradas geneticamente idênticas às células do animal receptor, e, por isso, livres de imunogenicidade. O implante como um todo, por outro lado, contém componentes orgânicos do doador do osso liofilizado (bovino), que não são totalmente eliminados pelo processo de

liofilização utilizado neste estudo, e conferem imunogenicidade ao material^(33,67,76). Dessa forma, no processo que se segue à implantação, pode-se supor a presença de alterações do microambiente relacionadas à resposta inflamatória e imunológica, bem como à fase inicial de neovascularização, de forma que a celularidade do construto pode ser abalada, mesmo que a agregação celular inicial tenha sido bem sucedida.

Os resultados finais negativos neste estudo *in vivo* não apóiam a perspectiva inicial de se utilizar o osso liofilizado bovino mineralizado como estrutura tridimensional e carreadora celular na engenharia tecidual com células-tronco mesenquimais. Mas o delineamento do estudo não permite determinar qual ou quais etapas do processo foram mal-sucedidas; e, por esse motivo, não é possível afirmar que os resultados negativos são decorrentes especificamente do uso do osso liofilizado bovino não-desmineralizado como carreador celular. Visando esclarecer o papel deste material na engenharia tecidual óssea, tornam-se necessários estudos subseqüentes que o avaliem em outros modelos experimentais, explorando separadamente cada etapa metodológica que possa influir no sucesso da engenharia tecidual óssea, desde a fase de preparo do material, cultivo e agregação celular ao material, procedimento cirúrgico e sítio de implantação. É importante que os estudos subseqüentes incluam no delineamento a comparação com outros materiais estruturais de utilidade já estabelecida como carreadores celulares, como, por exemplo, as cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico. A nosso ver, as etapas críticas para o processo de engenharia tecidual óssea, que merecem atenção particular nos próximos estudos, são a agregação celular ao material na etapa *ex vivo*, e a fase de integração do implante imediatamente após o procedimento cirúrgico, com a influência da resposta inflamatória e imunológica que se segue.

6 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a agregação de células monocucleares da medula óssea, de células-tronco mesenquimais ou de células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico sobre estrutura tridimensional de osso liofilizado bovino não-desmineralizado não conferiu ao material propriedade osteogênica, no modelo testado e com os métodos utilizados.

Neste estudo, não se confirmou a possibilidade de utilizar o osso liofilizado bovino não-desmineralizado como estrutura tridimensional carreadora para engenharia tecidual óssea com células-tronco mesenquimais.

7 REFERÊNCIAS

- 1 Alam MI, Asahina I, Seto I, Oda M, Enomoto S. Prefabricated vascularized bone flap: a tissue transformation technique. *PlastReconstrSurg* 108(4):952-8 Sep15, 2001.
- 2 Hartman EH, Spauwen PH, Jansen JA. Donor-site complications in vascularized bone flap surgery. *JInvestSurg* 15(4):185-97 Jul-Aug2002.
- 3 Safak T, Akyürek M, Özcan G, Keçik A, Aydın M. Osteocutaneous flap prefabrication based on the principle of vascular induction. *PlastReconstrSurg* 105(4):1304-13 Apr2000.
- 4 Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *PlastReconstrSurg* 101(3):572 Mar1998
- 5 Abbase EA, Shenaq SM, Spira M, El-Falaky MH. Prefabricated flaps: experimental and clinical review. *PlastReconsSurg* 96(5):1218-25;Oct1995.
- 6 Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *ClinOrthopRelRes* 395:66-80, 2002.
- 7 Gundle R, Joyner CJ, Triffit JT. Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. *Bone* 16:597-612, 1995.
- 8 Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* 13:81-89, 1992.
- 9 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* 138:4456, 1997.
- 10 Niedzwiedzki T, Drabowski Z, Miszta H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 14:115-9, 1993.
- 11 Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *JCraniofacSurg* 12(6):586-93, Nov2001.
- 12 Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kutznetsov S, Hoyt RDVM, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *ArchSurg* 136(3):263-270, Mar2001.
- 13 Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *ClinOrthop* 262:298, 1991.

- 14 Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S, Ohta T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69(1):128-34, Jan15,2000.
- 15 Riminucci M, Bianco P Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *BrasJMedBiolResearch* 36:1027-36; 2003
- 16 Pelissier P. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within madreporic ceramic in rats. *PlastReconstrSurg* 111(6):1932 May2003
- 17 Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *JCellBiochem* 2:570-85, 1999.
- 18 Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *BrJHaematol* 123(4):702-11; Nov 2003.
- 19 Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata KI, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofacial Surg* 13(2):231-39; Mar2002.
- 20 Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carrier. *Biomaterials* 26:2501-2507; 2005.
- 21 Alan MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials* 22:1643-1651; 2001.
- 22 Habibovic P, Yuan H, Valk CM, Meijer G,Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-3575; 2005.
- 23 Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, Yonemasu K, Hosoi H. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Jmater Sci:MaterMed* 17:327:336;2006.
- 24 Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, Helbig L, Weiss S, Fellenberg J, Leo A, Simank HG, Richter W. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 26:5879-89; 2005.
- 25 Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 360:71-86;1999.
- 26 Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 33(2):391-400;1995.

- 27 Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 35(6):219-24; 2000.
- 28 Albrektsson T. Repair of bone grafts: a vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 14: 1-12;1980.
- 29 Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático: estudo experimental em coelhos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Univ. Federal de São Paulo; 1997.
- 30 Jesus-Garcia Filho R, Laredo Filho JL, Korukian M, Lomônaco ET. Enxerto homólogo de banco no tratamento dos tumores ósseos: experiência inicial da Escola Paulista de Medicina. *Rev Bras Ortop* 27: 844-8;1992.
- 31 Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 150(698): 893-9; Nov1965. (republicado em *Clin Orthop Relat Res* 395:4-10; Feb 2002)
- 32 Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM Lieberman JR. Bone morphogenetic protein – 2: biology and applications. *Clin Orthop Rel Res* 324:39-45;1996.
- 33 Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res* 371:10-27;2000.
- 34 Ekelund A, Aspenberg P, Nilsson O. No effect of immunosuppression with cyclosporine A detected on bone ingrowth into cancellous allo and xenografts in the rat. *Acta Orthop Scand* 70(5):491-6;1999.
- 35 Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 27(5):911-25;1994.
- 36 Cutting CB, McCarthy JG, Knize DM. Repair and grafting of bone. In: McCarthy JG, editor. *Plastic Surgery*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. 1990; p.583-629.
- 37 Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland: experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank. *Acta Orthop Scand* 69:559-65; 1998.
- 38 Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 34(9-10):529-34;1999.
- 39 Stefani AE, Oliveira LF, Fernandez P. Banco de osso: um método simplificado. *Rev Bras Ortop* 24(3): 66-72;1989.
- 40 Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect* 17: 159-69;1991.
- 41 Zasacki, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. *Clin Orthop Rel Res* 272: 82-7;1991.

- 42 Frost DE, Fonseca RJ, Burkes Jr EJ. Healing of interpositional allogenic lyophilized bone grafts following total maxillary osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg* 40:776-86;1982.
- 43 Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone graft in the cranial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg* 102(2): 291-9; Aug 1998.
- 44 Silva ABD, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Reis LM, et al. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. *Acta Cir Bras* 15(S3): 65-8;2000.
- 45 Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 290: 279-84;1993.
- 46 Feofiloff ET, Jesus-Garcia R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos. *Rev Bras Ortop* 31(11): 895-903;1996.
- 47 Duarte LS, Schaeffer L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Rev Bras Eng Biom* 16(2): 89-93;2000.
- 48 Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 121(10): 583-90;2001.
- 49 Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop Rel Res* 234:235-9;1988.
- 50 Scott CK, Bain SD, Hightower JA. Intramembranous bone matrix is osteoinductive. *Anat Rec* 238(1): 23-30; Jan 1994.
- 51 Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop* 35(5):165-172;2000.
- 52 Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2004.
- 53 Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 290:279-84; 1993.
- 54 Vajjaradul Y. Bone banking in Thailand: a ten-year experience (1984-1994). *Clin Orthop Rel Res* 323:173-80; 1996.
- 55 Hirn MYJ, Krusius T. Retesting of bone donors 2 months after donation guarantees sufficient safety of bone allografts. *Arch Orthop Scand* 69(6): 566-9;1998.

- 56 Almeida OM, Alonso N, Buchipiguel C, Pinheiro EA, Ferreira MC. Enxerto ósseo membranoso e endocondral: estudo comparativo e cintilográfico de perda de volume. *Rev Soc Bras Cir Plast* 10:53-8;1995.
- 57 Cook SD, Salkeld SL, Prewett AB. Simian immunodeficiency virus (human HIV-II) transmission in allograft bone procedures. *Spine* 20: 1338-42;1995.
- 58 Biagini S, Melende S, Wendel RF, Wendel S, Rudelli AS, Amatuzzi M. Padronização de rotina operacional em banco de ossos realizada por um serviço hemoterápico: propostas de elaboração de normas. *Rev Bras Ortop* 34(6): 381-4;1999.
- 59 Ferreira SD, Dernel WS, Powers BE, Schochet RA, Kuntz CA, Withrow SJ et al. Effect of gas-plasma sterilization on the osteoconductive capacity of demineralized bone matrix. *Clin Orthop Rel Res* 388:233-9;2001.
- 60 Viceconti M, Toni A, Brizio L, Rubbini L, Borrelli A. The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* 81(1): 63-8;1996.
- 61 Fideler BM, Vangsness Jr T, Lu B, Orlando C, Moore T. Gamma irradiation: effects on biomechanical properties of human bone-patellar tendon-bone allografts. *Am J Sports Med* 23(5): 643-6; 1995.
- 62 Alberius P, Gordh M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:1382-6; Dec1998.
- 63 Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long terms results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Rel Res* 324:86-97;1996.
- 64 Doi K, Akino T, Shigetomi M, Maramatsu K, Kawai S. Revascularized intercalary bone allografts with short-term immunosuppression with cyclosporine in the canine. *Plast Reconstr Surg* 101(3):793-801; Mar 1998.
- 65 Gosain AK, Song L, Capel CC, Corrao MA, Lim TH. Biomechanical and histologic alteration of facial recipient bone after reconstruction with autogenous bone graft and alloplastic implants: 1-Year study. *Plast Reconstr Surg* 101(6):1561-71; May1998.
- 66 Schwartz HC, Leake DL, Kagan AR, Snow H, Pizzoterrato A. Postoperative irradiation of autogenic cancellous bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 77(1):122-6; Jan1986.
- 67 Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 323:66-74;1996.
- 68 Mellonig JT. Bone allografts in periodontal therapy. *Clin Orthop Rel Res* 324:116-25;1996.
- 69 Thorén K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Rel Res* 311: 232-46;1995.

- 70 Sailer HF, Pajarola GF. Cirurgia Bucal. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000. Pp. 213-20.
- 71 Martins-Costa J, Fernandes M, Goldim JR. Lei de Biossegurança - Medusa Legislativa? *Jornal da ADUFRGS* 134:19-21;maio2005
- 72 Ravaglioli A, Krajewski A. Bioceramics: materials, properties, applications. New York: Chapman & Hall, 1992.
- 73 Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol.* 60(1):12-8; Jan1989.
- 74 Mauney JR, Jaquiere C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 26(16):3173-85;Jun2005
- 75 Hachiya Y, Sakai T, Narita Y, Izawa H, Iwata H, Yoshizawa H et al. Status of bone banks in Japan. *Transpl Proc* 31: 2032-5; 1999.
- 76 Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand* 70(4):374-80;1999.
- 77 Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft - bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol* 88(3):186-92;1999.
- 78 Stucki U, Schmid J, Hammerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 12(2):121-7;2001.
- 79 Portinho CP. Reconstrução óssea experimental de calota craniana com enxerto de células-tronco mesenquimais. [dissertação de mestrado] Porto Alegre (RS): Curso de Pós-Graduação: Cirurgia - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
- 80 Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* 10(1-2):81-92;Jan-Feb 2004.
- 81 Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 14(2):193-202; Mar-Apr 1998.
- 82 Portinho CP, Collares MVM, Silva FH, Nardi N, Pinto RDA, Siqueira E, Morellato G, Sumino K. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. (aceito para publicação) *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.* 2006; 21(3).

-
- 83 Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2002.

8 ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS - OSSO LIOFILIZADO BOVINO NÃO-DESMINERALIZADO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA ENGENHARIA TECIDUAL - ESTUDO EXPERIMENTAL EM SÍTIO HETEROTÓPICO

**Victor Vieira Orsi, Marcus Vinícius Martins Collares, Nance Beyer Nardi,
Rinaldo De Angeli Pinto, Lindolfo da Silva Meirelles, Luíse Meurer,
Carmen Pilla, Ciro Paz Portinho, Márcia Riboldi, Tais Bauer Auler**

Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial – Serviço de Cirurgia Plástica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

Avaliou-se o uso de células da medula óssea, com potencial osteogênico, agregadas a estrutura tridimensional de osso liofilizado bovino não-desmineralizado para engenharia tecidual óssea. Os animais doadores de células da medula óssea, assim como os animais receptores dos construtos ósseos, foram camundongos de linhagem isogênica C57Bl/6. Utilizou-se modelo experimental heterotópico, com a implantação dos construtos no plano subcutâneo no dorso dos animais. Foram organizados 4 grupos de comparação (n=10 animais em cada grupo): 1) OL isoladamente (grupo controle); 2) OL + células mononucleares da medula (CMM); 3) OL + células-tronco mesenquimais (CTM); 4) OL + células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteoindutor (CTMdif). A aferição foi realizada após 5 semanas, com avaliação histológica e determinação da atividade de fosfatase alcalina. Os resultados da avaliação histológica não mostraram diferença entre os grupos de comparação, com a observação em todas as amostras de tecido conjuntivo fibroso rico em neovasos estendendo-se por entre as trabéculas ósseas, sem osteoblastos ou osteócitos viáveis e sem neoformação óssea. Os resultados da atividade de fosfatase alcalina também não mostraram diferença entre os grupos de comparação, com análise de variância entre os grupos mostrando $p=0,867$. Com esses resultados, o presente estudo conclui que, no modelo estudado e com os métodos utilizados, a adição de células da medula óssea com potencial osteogênico sobre estrutura de osso liofilizado bovino não-desmineralizado não agregou propriedades osteogênicas ao material. Não se confirmou a perspectiva inicial de utilizá-lo como estrutura tridimensional e carreadora celular na engenharia tecidual óssea, sendo necessários estudos subseqüentes que o avaliem em outros modelos experimentais, comparando com outros materiais de uso já estabelecido, e explorando separadamente cada etapa metodológica que possa influir no sucesso da engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Engenharia tecidual; Osso liofilizado

1 INTRODUÇÃO

Em cirurgias craniomaxilofaciais, frequentemente é necessária a reparação de perdas ósseas com uso de enxertos. O enxerto ósseo autólogo é considerado o melhor material para este propósito (padrão-ouro), e pode ser obtido de zonas doadoras apropriadas, no mesmo ato operatório ⁽¹⁻⁴⁾. Visando diminuir a morbidade cirúrgica nas zonas doadoras, ou quando grandes quantidades de tecido são necessárias, podem ser usados materiais de substituição óssea ^(5,6). Os enxertos ósseos homólogos ou xenólogos são opções importantes, devido à similaridade com o osso autólogo em termos de estrutura e função ⁽⁷⁾. Entretanto, os enxertos não-autólogos exigem processos de preparo, como a liofilização, com o objetivo de diminuir a imunogenicidade, diminuir o risco de transmissão de doenças do doador para o receptor, e facilitar o armazenamento do material ^(8,12).

O processo de liofilização elimina o componente celular do enxerto ósseo, eliminando com isso a sua capacidade osteogênica ^(7,9). Entretanto, o processo preserva parte do componente orgânico do enxerto, incluindo fatores incorporados à matriz óssea (entre eles as proteínas morfogenéticas ósseas - BMPs), que atribuem ao material propriedade osteoindutora ^(13,14). Com essa propriedade, os enxertos liofilizados são capazes de promover o recrutamento de células progenitoras do hospedeiro e estimular sua diferenciação óssea, o que se presume que favoreça a osteointegração do enxerto ^(7,14). Acredita-se que a desmineralização dos enxertos aumenta a exposição de fatores osteogênicos solúveis e insolúveis presentes na matriz calcificada, o que favorece a osteoindução ⁽⁷⁾. Há controvérsias na literatura sobre a capacidade osteoindutiva de enxertos ósseos liofilizados não-desmineralizados, visto que alguns estudos não demonstraram essa capacidade quando o material foi implantado em sítio heterotópico ^(14,15).

A engenharia tecidual com células-tronco traz uma perspectiva importante de agregar qualidade aos materiais de substituição óssea, pois permite adicionar componente celular autólogo ao material, e com isso conferir-lhe propriedade osteogênica ^(7,16,17). A medula óssea representa uma fonte particularmente atrativa de células estromais com potencial osteogênico ⁽¹⁸⁾ para essa finalidade, visto que existem formas estabelecidas de obtê-las, de separar as células-tronco mesenquimais, e de expandi-las e diferenciá-las em cultura *ex vivo* ^(7,20). Diversos autores têm demonstrado o potencial das células-tronco mesenquimais em

reconstituir tecido ósseo em modelos experimentais *in vivo* ⁽²¹⁻²⁴⁾. A interação entre as células-tronco mesenquimais e os biomateriais que servirão como estruturas tridimensionais (*scaffolds*) é de grande importância para o sucesso da engenharia tecidual óssea ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Mauney demonstrou recentemente (2006) que matrizes ósseas xenólogas (de origem bovina), tanto desmineralizadas como não-desmineralizadas, podem ser utilizados como estrutura carreadoras de células-tronco para engenharia tecidual óssea ⁽⁷⁾. Entretanto, são poucos os estudos na literatura que exploram o uso de matrizes ósseas **liofilizadas** como carreadoras celulares para engenharia tecidual óssea ⁽²⁸⁾.

O objetivo deste estudo é avaliar o uso de estrutura tridimensional de osso liofilizado bovino não-desmineralizado como carreador de células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual óssea, em modelo heterotópico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Os animais doadores de células da medula óssea, assim como os animais receptores dos construtos ósseos, foram camundongos fêmeas adultas de linhagem isogênica C57Bl/6. Foram utilizados 40 animais, divididos em 4 grupos. Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico de inserção de implante no plano subcutâneo no dorso, e os implantes consistiram em osso liofilizado bovino não-desmineralizado (OL) associado a diferentes grupos celulares:

- Grupo 1: OL isoladamente (grupo controle)
- Grupo 2: OL + células mononucleares da medula (CMM)
- Grupo 3: OL + células-tronco mesenquimais (CTM)
- Grupo 4: OL + células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteoindutor (CTMdif)

2.2 Preparo dos blocos de osso liofilizado

Foi utilizado osso liofilizado (OL) não-desmineralizado de origem bovina. Como existe divergência na literatura sobre a propriedade osteoindutiva do osso liofilizado não-desmineralizado, e acredita-se que a idade do doador pode influir nessa propriedade ⁽¹³⁾, tomou-se o cuidado de utilizar material proveniente do mesmo animal, ao longo de todo o projeto. Foi utilizada somente a porção medular da cabeça femoral, visando obter macroestrutura porosa homogênea, e a secção dos blocos, com dimensões de 8x8x2mm, foi realizada previamente ao processo de liofilização.

Seguiu-se o protocolo de liofilização do Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), descrito abaixo:

- imersão por 1 hora em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %;
- lavagem em água filtrada a 4 °C;
- centrifugação a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos;
- desengorduramento em temperatura ambiente em uma solução de clorofórmio e metanol na diluição de 1:1. Durante este processo, a mistura de clorofórmio e metanol é continuamente agitada e trocada nas primeiras horas, e depois a cada hora de acordo com a sua coloração, permanecendo nesta mistura por 48 horas;
- centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos;
- aeração em contato direto com o meio ambiente por 24 horas para evaporação do metanol e do clorofórmio;
- lavagem e agitação em água filtrada a 4°C por 24 horas;
- centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos;
- liofilização a frio (-40°C) durante 7 dias;
- empacotamento em embalagens gás permeáveis;
- esterilização em autoclave por 10 minutos a 121°C.

Tendo em vista a utilização do material para uso em contato com células em cultura, foi implantada uma modificação, visando evitar o risco de toxicidade celular: aumento no tempo de aeração para 14 dias, para eliminar resíduos de agentes desengordurantes voláteis. Antes de colocar os blocos em contato com as células, foram imersos no meio de cultura até haver estabilização do pH.

2.3 Cultivo celular

Foram utilizadas células da medula óssea de camundongos da linhagem isogênica C57Bl/6 – mesma linhagem dos animais receptores dos construtos ósseos. As etapas de obtenção das células da medula de ossos longos, separação e cultura das células plástico-aderentes, assim como a etapa de diferenciação osteogênica *in vitro*, foram realizadas no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – com os métodos previamente descritos por Meirelles e cols., 2003 ⁽²⁰⁾.

Grupo 1 (grupo controle) - os blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado (OL) **não** foram colocados em contato com células, previamente à implantação.

Grupo 2 - foram utilizadas **células mononucleares** obtidas da **medula de ossos longos (CMM)**, conforme protocolo descrito por Meirelles e cols. ⁽²⁰⁾, suspensas na concentração de 10^6 células viáveis por mililitro, e colocadas em contato com os blocos de OL por 24 horas previamente à implantação.

Grupo 3 - foram utilizadas **Células-Tronco Mesenquimais (CTM)** seguindo o protocolo descrito por Meirelles e cols. ⁽²⁰⁾, **sem** indução em meio osteogênico. Conforme demonstrado em estudo prévio ⁽²⁰⁾, as células obtidas por esse processo são células plástico-aderentes capazes de ser expandidas *in vitro* por mais de 50 passagens, podem ser induzidas a diferenciação osteogênica ou adipogênica, e podem suportar o crescimento e a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas – motivos pelos quais são definidas operacionalmente como Células-Tronco Mesenquimais (CTM). Essas células apresentam marcadores de superfície CD44, CD49e, CD29 e Sca-1, e exibem morfologia homogênea e característica ⁽²⁰⁾. As CTM obtidas por esse método foram ressuspensas na concentração de 10^6 células viáveis por mililitro, e mantidas em contato com os blocos de OL por 24h previamente à implantação.

Grupo 4 - foram utilizadas Células-Tronco Mesenquimais obtidas pelo método descrito acima, ressuspensas na mesma concentração de 10^6 por mililitro, colocadas em contato com os blocos de OL e em meio osteogênico por 3 semanas (**CTMdif**). O meio osteogênico utilizado foi constituído do meio normal suplementado com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato, em concentrações descritas abaixo e seguindo o protocolo descrito por Phinney e cols. (1999)⁽²⁹⁾, modificado por Meirelles e cols. (2003)⁽²⁰⁾:

- Meio Normal: meio DMEM + soro fetal bovino (FBS) a 10% + solução tampão HEPES
- Dexametasona 10^{-8} M
- Ácido ascórbico-2-fosfato - 5 μ g/ml
- β -glicerol fosfato 10 mM

2.4 Procedimento cirúrgico de implantação *in vivo*

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina e xilazina, em condições de assepsia, e em conformidade com as normas do Centro de Pesquisa do HCPA. Cada animal recebeu 1 (um) implante no plano subcutâneo no dorso, inserido através de incisão no sentido vertical na linha média do dorso e dissecação roma até a região infraescapular, sobre o músculo grande dorsal. As incisões foram suturadas com mononylon 4-0. Os animais receberam analgesia nas primeiras 24 horas de pós-operatório, com tramadol injetável.

2.5 Aferição

Os animais foram sacrificados 5 semanas após o procedimento de implantação do construto ósseo, utilizando câmara de CO₂, conforme protocolo do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O implante foi retirado com uma margem de tecidos moles adjacentes (Figura 1), e foi seccionado em 2 fragmentos: para avaliação histológica e para determinação da atividade de fosfatase alcalina (FA).



Figura 1 – Retirada do implante com margem de tecidos moles adjacentes.

O preparo histológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa do HCPA, com os seguintes cuidados: fixação em formalina a 10% por 48 horas, descalcificação em solução de ácido nítrico, inclusão em parafina, cortes histológicos escalonados (5 cortes por fragmento), e coloração por hematoxilina-eosina. A avaliação histológica por microscopia óptica foi realizada por patologista cegado com relação aos grupos em estudo, com os seguintes critérios: a celularidade (presença, quantidade e localização de células ósseas dentro do bloco de osso liofilizado), e a presença de matriz óssea neoformada.

A determinação da atividade de **fosfatase alcalina (FA)**, foi realizada na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A FA é uma enzima que reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção do *turnover* ósseo ⁽¹⁷⁾, e aumentando precoce e significativamente nas situações de regeneração óssea ou osteoneogênese ⁽³⁸⁾. Utilizou-se protocolo desenvolvido previamente para a determinação da atividade de fosfatase alcalina em construtos ósseos ou materiais de substituição óssea desenvolvidos por engenharia tecidual, apresentado por Portinho e colaboradores⁽²⁸⁾. Esse protocolo utiliza o kit Sera-Pak Plus[®]- marca registrada Bayer, baseado em determinação cinética onde a enzima promove o desdobramento do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol, com mensuração espectrofotométrica.

2.6 Análise estatística

Os valores obtidos nas dosagens bioquímicas de Fosfatase Alcalina foram descritos pela média e desvio-padrão de cada grupo em estudo, e pela análise de

variância (ANOVA) de variáveis paramétricas, com realização de testes de comparação múltipla pós-análise (SNK). Considerou-se um valor $p \leq 0.05$ como significativo. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS versão 14, disponibilizado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

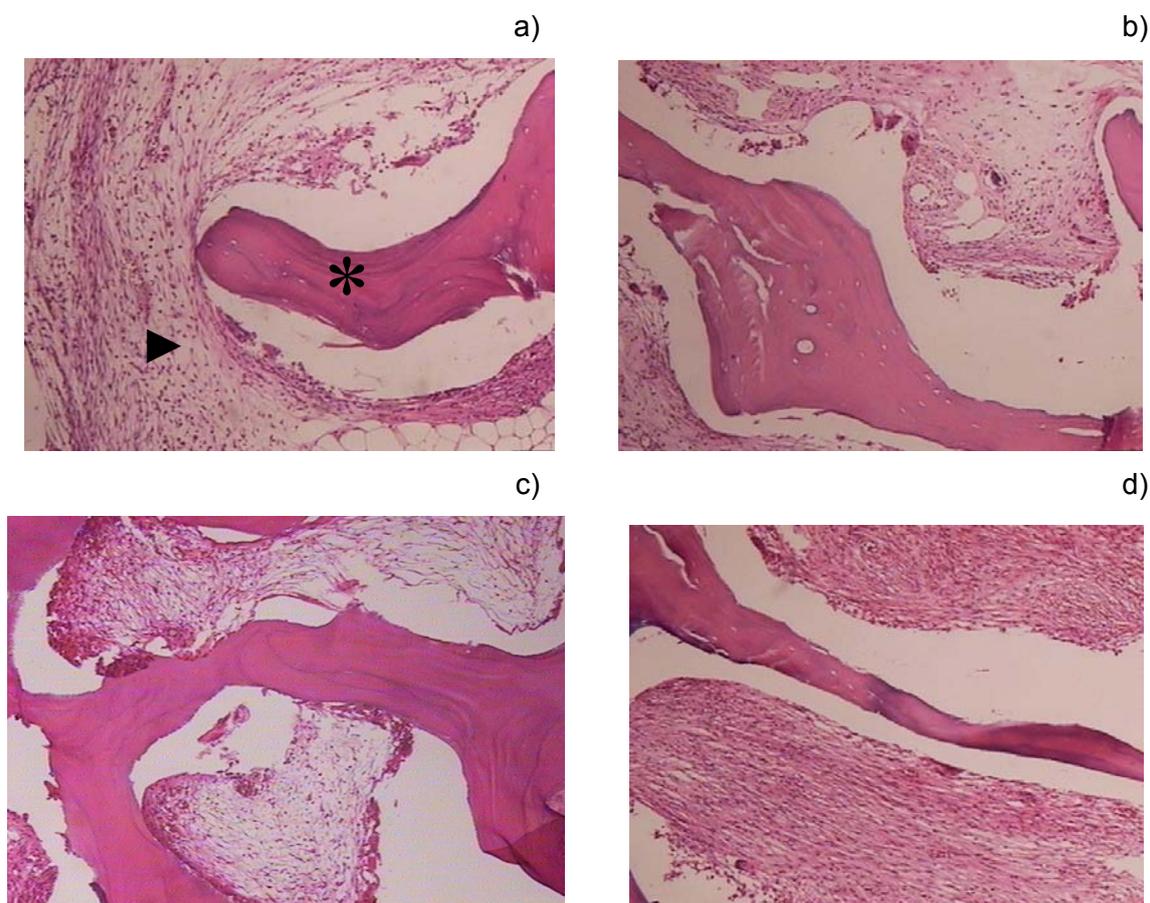
O projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3 RESULTADOS

Dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico de implantação do construto ósseo, foram eliminados aqueles em que houve extrusão do construto. Não houve outros motivos de perda.

No **exame histológico** avaliado qualitativamente, não houve diferença entre os grupos de comparação. Em todas as amostras visualizou-se processo inflamatório crônico, com nítida reabsorção óssea, incluindo células gigantes multinucleadas, com tecido conjuntivo circunjacente ao implante estendendo-se por entre as trabéculas ósseas como tecido fibroso rico em neovasos (ver Figura 2). Não foram visualizados osteoblastos ou osteócitos viáveis, nem neoformação óssea, em nenhum dos cortes histológicos examinados, nos 4 grupos de comparação.

Os resultados da determinação da **atividade de fosfatase alcalina** são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de fosfatase alcalina entre os diferentes grupos de comparação, com análise de variância (ANOVA) entre grupos mostrando $p=0,867$.



- * trabécula óssea em reabsorção
- ◄ tecido fibroso com inflamação crônica

Figura 2 - Cortes histológicos dos construtos ósseos, 5 semanas após a implantação em sítio subcutâneo no dorso. Aumento 50x, coloração HE. a) Grupo 1 - OL controle; b) Grupo2 - OL + CMM; c) Grupo3 - OL + CTM; d) Grupo4 - OL + CTMdif.

Tabela 1 - Atividade de fosfatase alcalina (FA)

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
1) OL (controle)	10	1,09	0,79
2) OL + CMM	10	1,04	0,81
3) OL + CTM	9	0,91	0,99
4) OL + CTMdif	10	0,79	0,83

ANOVA: $F=0,241$; $P=0,867$ (NS)

OL,osso liofilizado bovino não-desmineralizado; CMM,células mononucleares da medula; CTM,células-tronco mesenquimais; CTMdif, células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo optou-se por um modelo experimental para avaliar construtos obtidos por engenharia tecidual óssea com células-tronco mesenquimais, implantados **em sítio heterotópico**. O modelo em sítio heterotópico, livre de estímulos biológicos existentes em locais de perda óssea, é adequado para definir se o material implantado tem propriedades osteoindutivas e osteogênicas, ou apenas osteocondutivas. O sítio subcutâneo no dorso de camundongos ou ratos mostrou-se satisfatório para desenvolvimento de tecido ósseo utilizando células-tronco em carreadores tridimensionais de cerâmica de hidroxiapatita e fosfato de cálcio^(6,17,26,27,31-33). Da mesma forma, optou-se por um período de seguimento após a implantação de 5 semanas, que tem se mostrado adequado em modelos similares^(27,31-33).

A opção por estudar o **osso liofilizado bovino não-desmineralizado** como biomaterial para engenharia tecidual óssea leva em conta as suas qualidades favoráveis para uso clínico, disponibilidade e aceitação no nosso meio. O osso liofilizado não-desmineralizado tem papel bem estabelecido como material de substituição óssea, com características de biocompatibilidade e biofuncionalidade favoráveis em longo prazo^(11,12,34,35). Apesar dessas características favoráveis, se contrapõe uma escassez de estudos utilizando esse material como estrutura tridimensional para engenharia tecidual óssea. O osso liofilizado não-desmineralizado é considerado um material osteocondutor, ainda que alguns autores considerem haver propriedades osteoindutivas, dependendo da idade do doador^(13,35). Consideramos importante estudar se o acréscimo de células-tronco mesenquimais ao osso liofilizado é capaz de atribuir a esse material propriedades osteogênicas.

As células agregadas aos implantes, nos grupos OL+ CMM (células mononucleares da medula), OL+ CTM (células-tronco mesenquimais) e OL+CTMdif (células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico) compreendem diferentes fases de separação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, com potencial osteogênico. Considera-se que a frequência de células-tronco mesenquimais entre as células nucleadas da medula óssea é de 1:11.300 a 1:27.000⁽²⁰⁾. Os métodos utilizados para obtenção de células da medula óssea dos camundongos isogênicos, separação celular, cultura de células-tronco

mesenquimais, e sua diferenciação em meio osteogênico têm sido objeto de estudos prévios no Laboratório de Imunogenética da UFRGS, com resultados já publicados⁽²⁰⁾. O objetivo de comparar células com potencial osteogênico em diferentes fases de separação e diferenciação foi verificar qual método obteria melhores resultados, com menor manipulação *ex vivo* possível.

A adesão das células da medula óssea ou das células-tronco mesenquimais ao material carreador é uma fase importante para o sucesso da engenharia tecidual óssea. Não há consenso na literatura sobre o método, a quantidade ou o período de exposição das células ao construto necessários para haver a adesão celular. Diferentes autores, em estudos bem-sucedidos de engenharia tecidual óssea com estruturas de cerâmicas de hidroxiapatita ou fosfato tricálcico^(6,17,26,31), utilizam métodos convencionais, similares ao utilizado neste estudo, em que se promove a suspensão das células no meio de cultura, e a seguir se permite sua sedimentação sobre os construtos. Os períodos de exposição das células aos construtos podem ser tão curtos quanto 2 (duas) horas, sem prejuízo para os resultados nesses estudos^(6,17). Mauney e cols.⁽⁷⁾, em estudo que utiliza células-tronco da medula óssea humanas sobre estrutura de matriz óssea bovina desengordurada, utiliza período inicial de exposição das células ao construto de 12 horas; entretanto, esse autor utiliza um método que favorece a infiltração do meio entre os poros do construto, por meio de centrifugação em um biorreator desenvolvido com essa finalidade. O autor denomina esse método de “cultivo celular dinâmico” (“*dynamic cell seeding*”) e demonstra suas vantagens ao promover adesão celular mais homogênea e favorecer a sua infiltração dentro da matriz óssea^(7,36,37). Esses autores ressaltam a importância dessa fase da engenharia tecidual quando os construtos são grandes, um quesito fundamental para a aplicabilidade clínica. No estudo de Mauney e cols., que obteve sucesso na engenharia tecidual utilizando matrizes ósseas desengorduradas⁽⁷⁾, os construtos tinham formato cilíndrico com 6mm de diâmetro por 3mm de espessura - dimensões comparáveis às dos blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado utilizados no presente estudo: 8x8x2mm. A necessidade de utilizar métodos mais elaborados para promover a adesão celular nesses construtos é um dos aspectos metodológicos que pode ser questionado.

Os resultados da avaliação histológica 5 semanas após a implantação *in vivo* mostraram não haver neoformação óssea ou presença de osteoblastos nos implantes, em nenhum dos grupos de comparação. Os resultados da atividade de

fosfatase alcalina (FA) mostraram não haver diferença significativa entre os grupos de comparação, com $p=0,867$; e os valores absolutos das mensurações nos 4 grupos de comparação podem ser considerados baixos: 0,959 em média. A FA é uma enzima que catalisa a hidrólise dos ésteres de fosfato em pH alcalino e parece ser um pré-requisito para a mineralização normal do esqueleto ⁽³⁰⁾. Segundo Yoshikawa (1999) ⁽³⁸⁾, a FA reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção do *turnover* ósseo. Em estudos de engenharia tecidual óssea, a fosfatase alcalina é produzida por osteoblastos e por células-tronco mesenquimais desde o início de sua diferenciação óssea ⁽¹⁷⁾, e apresenta estreita correlação com outros indicadores utilizados para a mesma finalidade, como a osteocalcina e a osteopontina ^(17,31,32).

Neste estudo, os resultados da histologia e da atividade de FA são concordantes no sentido de não haver atividade osteoblástica nas amostras avaliadas, em todos os grupos de comparação. Podemos, com isso, afirmar que a utilização de células mononucleares da medula (CMM), células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico (CTMdif) não conferiu ao osso liofilizado bovino não-desmineralizado propriedades osteogênicas, nesse modelo experimental e com os materiais e métodos utilizados. Entretanto, para uma visão mais esclarecedora sobre o papel do osso liofilizado não-desmineralizado na engenharia tecidual óssea, tornam-se necessários estudos específicos sobre cada etapa do processo.

Na engenharia tecidual óssea, a interação entre as células com potencial osteogênico e o material estrutural é um processo reconhecidamente complexo e ainda pouco compreendido ⁽²⁵⁾. Conforme foi discutido previamente, alguns autores valorizam a utilização de métodos sofisticados de exposição das células aos construtos, visando favorecer sua adesão *ex vivo* ^(7,36,37), e consideram essa etapa como fundamental para o sucesso da engenharia tecidual. Além da adesão celular inicial, é necessária uma interação com a superfície do material que favoreça o crescimento e diferenciação celular, e posteriormente a deposição de matriz óssea ⁽²⁵⁾. Alguns estudos com cerâmicas de hidroxiapatita demonstram que as características microestruturais do material podem influir no sucesso dessa interação ^(26,27). Não existe informação na literatura sobre o processo de adesão e interação de células-tronco mesenquimais à superfície de osso liofilizado não-desmineralizado. O estudo de Mauney e cols. com matrizes ósseas bovinas desengorduradas (não-

liofilizadas), desmineralizadas ou não-desmineralizadas ⁽⁷⁾, demonstra sucesso na agregação e diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais na fase *ex vivo*, e demonstra sucesso em obter neoformação óssea *in vivo* em 55% dos implantes. Esse estudo sustenta a possibilidade de utilizar matrizes ósseas bovinas como estrutura carreadora, mas os resultados não podem ser generalizados para o osso bovino liofilizado utilizado no presente estudo, devido às diferenças importantes no preparo do material ósseo e às diferenças na metodologia de exposição das células aos construtos.

Além da adequada interação célula-material, existem outros aspectos metodológicos que são importantes para obter sucesso na engenharia tecidual óssea. O procedimento cirúrgico de implantação e a integração do construto no sítio receptor também representam uma fase crítica para o sucesso da engenharia tecidual. Nessa fase, há risco importante de perda de células, mesmo que elas estejam adequadamente agregadas ao construto ósseo *ex vivo*. Sabe-se que mesmo nos enxertos autólogos, isentos de resposta imunológica, apenas uma pequena fração das células transplantadas irá permanecer viável após a enxertia ^(8,39). O procedimento de enxertia/implantação desencadeia uma resposta que inclui a reação inflamatória ao trauma cirúrgico e a reação imune do hospedeiro ao implante, e a este processo segue-se a migração de células do hospedeiro e o início da neovascularização, resultando na formação de um estroma fibrovascular ^(8,40). Todas as células utilizadas neste estudo, sendo obtidas de animais da mesma linhagem isogênica, podem ser consideradas geneticamente idênticas às células do animal receptor, e, por isso, livres de imunogenicidade. O implante como um todo, por outro lado, contém componentes orgânicos do doador do osso liofilizado (bovino), que não são totalmente eliminados pelo processo de liofilização utilizado neste estudo, e conferem imunogenicidade ao material ^(8,39,40). Dessa forma, no processo que se segue à implantação, pode-se supor a presença de alterações do microambiente relacionadas à resposta inflamatória e imunológica, bem como à fase inicial de neovascularização, de forma que a celularidade do construto pode ser abalada, mesmo que a agregação celular inicial tenha sido bem sucedida.

Os resultados finais negativos neste estudo *in vivo* não apóiam a perspectiva inicial de se utilizar o osso liofilizado bovino mineralizado como estrutura tridimensional e carreadora celular na engenharia tecidual com células-tronco mesenquimais. Mas o delineamento do estudo não permite determinar qual ou quais

etapas do processo foram mal-sucedidas; e, por esse motivo, não é possível afirmar que os resultados negativos são decorrentes especificamente do uso do osso liofilizado bovino não-desmineralizado como carreador celular. Visando esclarecer o papel deste material na engenharia tecidual óssea, tornam-se necessários estudos subseqüentes que o avaliem em outros modelos experimentais, explorando separadamente cada etapa metodológica que possa influir no sucesso da engenharia tecidual óssea, desde a fase de preparo do material, cultivo e agregação celular ao material, procedimento cirúrgico e sítio de implantação. É importante que os estudos subseqüentes incluam no delineamento a comparação com outros materiais estruturais de utilidade já estabelecida como carreadores celulares, como, por exemplo, as cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico. A nosso ver, as etapas críticas para o processo de engenharia tecidual óssea, que merecem atenção particular nos próximos estudos, são a agregação celular ao material na etapa *ex vivo*, e a fase de integração do implante imediatamente após o procedimento cirúrgico, com a influência da resposta inflamatória e imunológica que se segue.

REFERÊNCIAS

- 1 Almeida OM, Alonso N, Buchipiguel C, Pinheiro EA, Ferreira MC. Enxerto ósseo membranoso e endocondral: estudo comparativo e cintilográfico de perda de volume. *Rev Soc Bras Cir Plást* 1995; 10:53-8.
- 2 Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 859-74.
- 3 Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático: estudo experimental em coelhos [tese de doutorado] . São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Univ. Federal de São Paulo; 1997.
- 4 Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2002.
- 5 Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995 Jan; 95(1): 5-20.
- 6 Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, Helbig L, Weiss S, Fellenberg J, Leo A, Simank HG, Richter W. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 26:5879-89; 2005.
- 7 Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* 10(1-2):81-92;Jan-Feb 2004.
- 8 Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res* 371:10-27;2000.
- 9 Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 27(5):911-25;1994.
- 10 Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland: experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank. *Acta Orthop Scand* 69:559-65; 1998.
- 11 Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 34(9-10):529-34;1999.
- 12 Duarte LS, Schaeffer L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Rev Bras Eng Biom* 16(2): 89-93; 2000.
- 13 Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 121(10): 583-90; 2001.

- 14 Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop Rel Res* 234:235-9; 1988.
- 15 Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol*. 60(1):12-8; Jan1989.
- 16 Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *ClinOrthop* 262:298, 1991.
- 17 Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S, Ohta T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69(1):128-34, Jan15,2000.
- 18 Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* 13:81-89, 1992.
- 19 Pelissier P. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within madreporic ceramic in rats. *PlastReconstrSurg* 111(6) :1932 May 2003.
- 20 Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *BrJHaematol* 123(4):702-11; Nov 2003.
- 21 Niedzwiedzki T, Drabowski Z, Miszta H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 14:115-9, 1993.
- 22 Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *JCraniofacSurg* 12(6):586-93, Nov 2001.
- 23 Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kutznetsov S, Hoyt RDVM, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *ArchSurg* 136(3):263-270, Mar 2001.
- 24 Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *ClinOrthop* 262:298, 1991.
- 25 Riminucci M, Bianco P Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *BrasJMedBiolResearch* 36:1027-36; 2003.
- 26 Habibovic P, Yuan H, Valk CM, Meijer G,Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-3575; 2005.
- 27 Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, Yonemasu K, Hosoi H. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in*

- vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Jmater Sci:MaterMed* 17:327:336; 2006.
- 28 Portinho CP, Collares MVM, Meirelles L, Silva FH, Pinto RDA, Nardi N, Pilla C, Meurer L, Edelweiss MIA, Riboldi M, Siqueira E, Morellato G, Renosto R, Sumino K. Reconstrução óssea experimental de calota craniana com enxerto de células-tronco mesenquimais. [dissertação de mestrado] Porto Alegre (RS): Curso de Pós-Graduação: Cirurgia - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
- 29 Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *JCellBiochem* 2:570-85, 1999.
- 30 Stucki U, Schmid J, Hammerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 12(2):121-7; 2001.
- 31 Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata KI, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofacial Surg* 13(2):231-39; Mar 2002.
- 32 Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carrier. *Biomaterials* 26:2501-2507; 2005.
- 33 Alan MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials* 22:1643-1651; 2001.
- 34 Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2004.
- 35 Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop* 35(5):165-172; 2000.
- 36 Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Tissue Eng.* 10(1-2):81-92; Jan-Feb 2004.
- 37 Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 14(2):193-202; Mar-Apr 1998.
- 38 Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft - bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol* 88(3):186-92; 1999.

-
- 39 Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand* 70(4):374-80; 1999.
- 40 Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 323:66-74; 1996.

9 ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS: BOVINE NON-DEMINERALIZED LYOPHILIZED BONE WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FOR TISSUE ENGINEERING: EXPERIMENTAL STUDY IN HETEROTOPIC SITE

**Victor Vieira Orsi, Marcus Vinícius Martins Collares, Nance Beyer Nardi,
Rinaldo De Angeli Pinto, Lindolfo da Silva Meirelles, Luíse Meurer,
Carmen Pilla, Ciro Paz Portinho, Márcia Riboldi, Tais Bauer Auler**

Craniomaxillofacial Surgery Unit – Plastic Surgery Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Immunogenetics Laboratory – Genetics Department – Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

The use of bone marrow cells with osteogenic potential seeded on bovine non-demineralized lyophilized bone scaffolds was evaluated for bone tissue engineering. Bone marrow cells donors, as well as the receptors of the bone constructs were C57Bl/6 isogenic line mice. A heterotopic experimental model was used, with implantation of the constructs into subcutaneous pouches on the backs of the animals. Four comparison groups were set (n=10 animals each group): 1) LB alone (control group); 2) LB + marrow mononuclear cells (MMC); 3) LB + mesenchymal stem cells (MST); 4) LB + mesenchymal stem cells differentiated in osteoinductive medium (MSTdif). The constructs were harvested 5 weeks after implantation for histological analysis and alkaline phosphatase activity test. The histological analysis did not show differences among the comparison groups. In all samples fibrous connective tissue rich in neovessels was observed extending through bone trabeculae, without viable osteoblasts or osteocytes and without new bone formation. Likewise, results of the alkaline phosphatase activity have not shown any difference among comparison groups, with the analysis of variance between groups showing p value=0.867. In this experimental model and with the methods used, the addition of bone marrow cells with osteogenic potential to a bovine non-demineralized lyophilized bone structure did not add osteogenic properties to the material. The initial perspective of using it as a scaffold for bone tissue engineering could not be confirmed, and further studies are required to assess it in other experimental models, comparing it with other materials currently in use and separately exploring each methodological step that might influence the success of bone tissue engineering.

Key words: Mesenchymal stem cells, Tissue engineering; lyophilized bone

1 INTRODUCTION

In craniomaxillofacial surgeries bone loss repair with the use of grafts is frequently required. Autologous bone grafts are considered the golden standard for this purpose and can be harvested from appropriate donor sites in the same surgery⁽¹⁻⁴⁾. In order to decrease surgical morbidity in donor sites or when large amounts of

tissue are required, bone replacement materials can be used ^(5,6). Homologous or xenologous bone grafts are important choices due to their similarity with autologous bone in terms of structure and function ⁽⁷⁾. However, non-autologous grafts require preparation processes, such as lyophilization, in order to decrease immunogenicity, decrease the risk of transmitting diseases from donor to receptor and facilitate material storage ⁽⁸⁻¹²⁾.

The lyophilization process eliminates the cellular component of bone graft, therefore eliminating its osteogenic capacity ^(7,9). However, the process preserves part of the organic component of the graft, including factors found in the bone matrix (among them bone morphogenetic protein – BMPs), that give osteoinductive properties to the material ^(13,14). This property enables lyophilized grafts to promote the recruitment of host stem cells and stimulate their differentiation into bone, what is assumed to favor the graft osteointegration ^(7,14). Demineralization of grafts is believed to increase the exposure of soluble and insoluble osteogenic factors present in the calcified matrix, therefore favoring osteoinduction ⁽⁷⁾. There are controversies in literature concerning the osteoinductive capacity of non-demineralized lyophilized bone grafts, since some studies have not shown this capacity when the material was implanted in a heterotopic site ^(14,15).

Stem cell tissue engineering brings an important perspective of adding quality to bone replacement materials because it enables the addition of autologous cell components to the material, therefore giving them osteogenic properties ^(7,16,17). The bone marrow is a particularly attractive source of stromal cells with osteogenic potential for this purpose ⁽¹⁸⁾, because methods have already been established to obtain them, separate mesenchymal stem cells and expand and differentiate them in ex vivo culture ^(7,20). Several authors have shown the potential mesenchymal stem cells have to repair bone tissue in in vivo experimental models ⁽²¹⁻²⁴⁾. These cells can also be grown and differentiated ex vivo using osteoinductive media to be reimplanted for bone tissue repair ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Mauney (2006) has recently shown that xenologous (bovine) bone matrices, both demineralized and non-demineralized, can be used as stem cell carrier structures for bone tissue engineering ⁽⁷⁾. However, there are few studies in literature exploring the use of **lyophilized** bone matrices as cell carriers (scaffolds) for bone tissue engineering ⁽²⁸⁾.

The aim of this study is to assess the use of a scaffold made of bovine non-demineralized lyophilized bone as a carrier of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering in a heterotopic model.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

The donors of bone marrow cells, as well as the receptors of the bone scaffolds were adult female mice of the C57Bl/6 isogenic line. Forty animals were used, divided into 4 groups. All animals underwent the same surgical procedure for implant placement subcutaneously on their back and implants consisted of bovine non-demineralized lyophilized bone (LB) with the addition of three different cell groups:

- Group 1: LB alone (control group)
- Group 2: LB + marrow mononuclear cells (MMCs)
- Group 3: LB + mesenchymal stem cells (MSCs)
- Group 4: LB + mesenchymal stem cells differentiated in an osteoinductive medium (MSCdif)

2.2 Preparation of the lyophilized bone blocks

Bovine non-demineralized lyophilized bone (LB) was used. Since there is disagreement in literature regarding the osteoinductive property of non-demineralized lyophilized bone and since donor age is believed to influence this property ⁽¹³⁾, measures were taken so that material from the same animal was used throughout the whole project. Only the medullary part of the femur head was used in order to obtain the homogenous porous macrostructure and the block sectioning, 8x8x2mm in size, was done prior to the lyophilization process.

The lyophilization protocol of the Tissue Bank of the Orthopedics and Traumatology Service at the Clínicas Hospital in Porto Alegre (HCPA) was used, as follows:

- immersion for 1 hour in a sodium hypochlorite solution at 0.5%;

- washing in filtered water at 4 °C;
- centrifugation at 2500 rotations per minute (rpm) for 10 minutes;
- defatting in room temperature in a solution of chloroform and methanol in a 1:1 dilution. During this process, the chloroform and methanol mixture is continuously stirred and changed in the first hours and then every hour depending on its color, remaining in this mixture for 48 hours;
- centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes;
- aeration in direct contact with the environment for 24 hours for methanol and chloroform evaporation;
- washing and stirring in filtered water at 4°C for 24 hours;
- centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes;
- cold lyophilization (-40°C) for 7 days;
- packaging in gas-permeable packages;
- sterilization in autoclave for 10 minutes at 121°C.

Since the material was to be used in contact with cells in culture, a change was introduced in order to avoid the risk of cell toxicity: increase in aeration time to 14 days to eliminate residues of volatile defatting agents. Before blocks were placed in contact with cells, they were immersed in the culture medium until pH stabilization was achieved.

2.3 Cell culture

Bone marrow cells from mice of the isogenic line C57Bl/6 were used – the same line of the animals that would received the bone scaffolds. The harvesting of marrow cells from long bones, the separation and culturing of plastic-adherent cells, as well as in vitro osteogenic differentiation were conducted at the Immunogenetics Laboratory – Genetics Department - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – using the methods previously described by Meirelles and coworkers, 2003⁽²⁰⁾.

Group 1 (control group) – the blocks of bovine non-demineralized lyophilized bone (LB) **were not** placed in contact with cells prior to their implantation.

Group 2 - **mononuclear cells** from **long bone marrow** (MMCs) were obtained following the protocol described by Meirelles ⁽²⁰⁾, suspended in a concentration of 10^6 viable cells per milliliter and placed in contact with the LB blocks for 24 hours prior to implantation.

Group 3 - **Mesenchymal Stem Cells (MSCs)** were used following the protocol described by Meirelles ⁽²⁰⁾, **without** induction in osteogenic medium. As shown in a previous study ⁽²⁰⁾, cells obtained through this process are plastic-adherent cells that can be expanded in vitro for over 50 passages, can be induced to either osteogenic or adipogenic differentiation and can support the growth and differentiation of hematopoietic stem cells – and for these reasons they are operationally defined as Mesenchymal Stem Cells (MSCs). These cells have CD44, CD49e, CD29 and Sca-1 surface markers and show homogeneous and characteristic morphology ⁽¹⁸⁾. MSCs obtained by this method were resuspended at a concentration of 10^6 viable cells per milliliter and maintained in contact with the LB blocks for 24 hours prior to their implantation.

Group 4 – Mesenchymal Stem Cells obtained using the previously described method were resuspended at the same concentration of 10^6 per milliliter, placed in contact with the LB blocks and in a osteogenic medium for 3 weeks (**MSCdif**). The osteogenic medium used was the normal medium supplemented with dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerolphosphate in the concentrations described below and following the protocol described by Phinney (1999) ⁽²⁹⁾, modified by Meirelles (2003) ⁽²⁰⁾:

- Normal medium: DMEM + fetal bovine serum (FBS) at 10% + HEPES buffer solution
- Dexamethasone 10^{-8} M
- Ascorbic acid-2-phosphate - 5 μ g/ml
- β -glycerolphosphate 10 mM

2.4 Surgical procedure for the *in vivo* implantation

Surgical procedures were conducted under anesthesia with ketamine and xylazine, aseptic conditions and according to the rules of the HCPA Research Center. Each animal received 1 (one) implant into subcutaneous pouches, inserted through a vertical incision in the midline of the back and a blunt dissection to the subscapular region under the latissimus dorsi. Incisions were sutured with mononylon 4-0. Animals were given analgesics in the first 24 hours post-operatively with administration of injectable tramadol.

2.5 Histological and Biochemical Analysis

Animals were euthanized 5 weeks after construct implantation, using a CO₂ chamber, following the protocol of the Research Center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The implant was harvested with a surrounding soft tissue margin (Figure 1), being subsequently sectioned in 2 fragments: one for **histological examination** and one for biochemical testing of **alkaline phosphatase (ALP) activity**.



Figure 1 – Removal of the implant with surrounding soft tissue margins

The histology material was prepared at the Pathology Laboratory of the Research Center of the HCPA according to the following procedures: formalin fixation, decalcification in nitric acid solution, inclusion in paraffin, divided histological sections (5 sections per fragment) and hematoxylin-eosin staining. Histological

assessment by light microscopy was conducted by a pathologist blind to the study groups, according to the following criteria: cellularity (presence, quantity and location of bone cells in the lyophilized bone block) and presence of newly formed bone matrix.

Alkaline phosphatase (ALP) activity testing was done at the Biomedical Research Unit of the Clinical Patology Service - Hospital de Clínicas de Porto Alegre. ALP is an enzyme that reflects osteoblast activity, increasing according to bone turnover ⁽¹⁷⁾, increasing early and significantly in the presence of bone repair or osteogenesis ⁽³⁸⁾. A protocol previously developed by Portinho and coworkers ⁽²⁸⁾ for alkaline phosphatase activity testing in bone scaffolds or bone replacement materials developed by tissue engineering was used. This protocol uses the Sera-Pak Plus[®] kit (Bayer), based on kinetic determination, using *p*-nitrophenylphosphate as a substrate, with spectrophotometric measurement.

2.6 Statistical Analysis

The values found in the biochemical Alkaline Phosphatase tests were described by the mean and the standard deviation in each study group and by analysis of variance (ANOVA) for parametric variables, with the performance of multiple post-analysis comparison tests (SNK). A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Data were processed and analyzed using the SPSS program, version 14, made available by the Research and Graduate Studies Group at Clínicas Hospital in Porto Alegre.

The project was approved in its ethical and methodological aspects by the Scientific Committee and the Committee of Research and Ethics in Healthcare of the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3 RESULTS

Implant extrusion caused animals that had undergone the surgical procedure for bone scaffold implantation to be excluded from the study. There was not any other reason for exclusion.

At the qualitatively assessed **histological evaluation**, no difference was found among the comparison groups. In all samples a chronic inflammatory process was found, with a clear bone resorption, including multinucleated giant cells, with the

connective tissue surrounding the implant extending through the bone trabeculae with fibrous tissue rich in neovessels (Figure 2). No viable osteoblasts or osteocytes were found, nor new bone formation, in any of the histological sections tested in the 4 comparison groups.

The results of the **alkaline phosphatase (ALP) activity** test are shown on Table 1. No statistically significant difference was found in alkaline phosphatase activity among the comparison groups, with the analysis of variance (ANOVA) between groups showing $p\text{-value} = 0.867$.

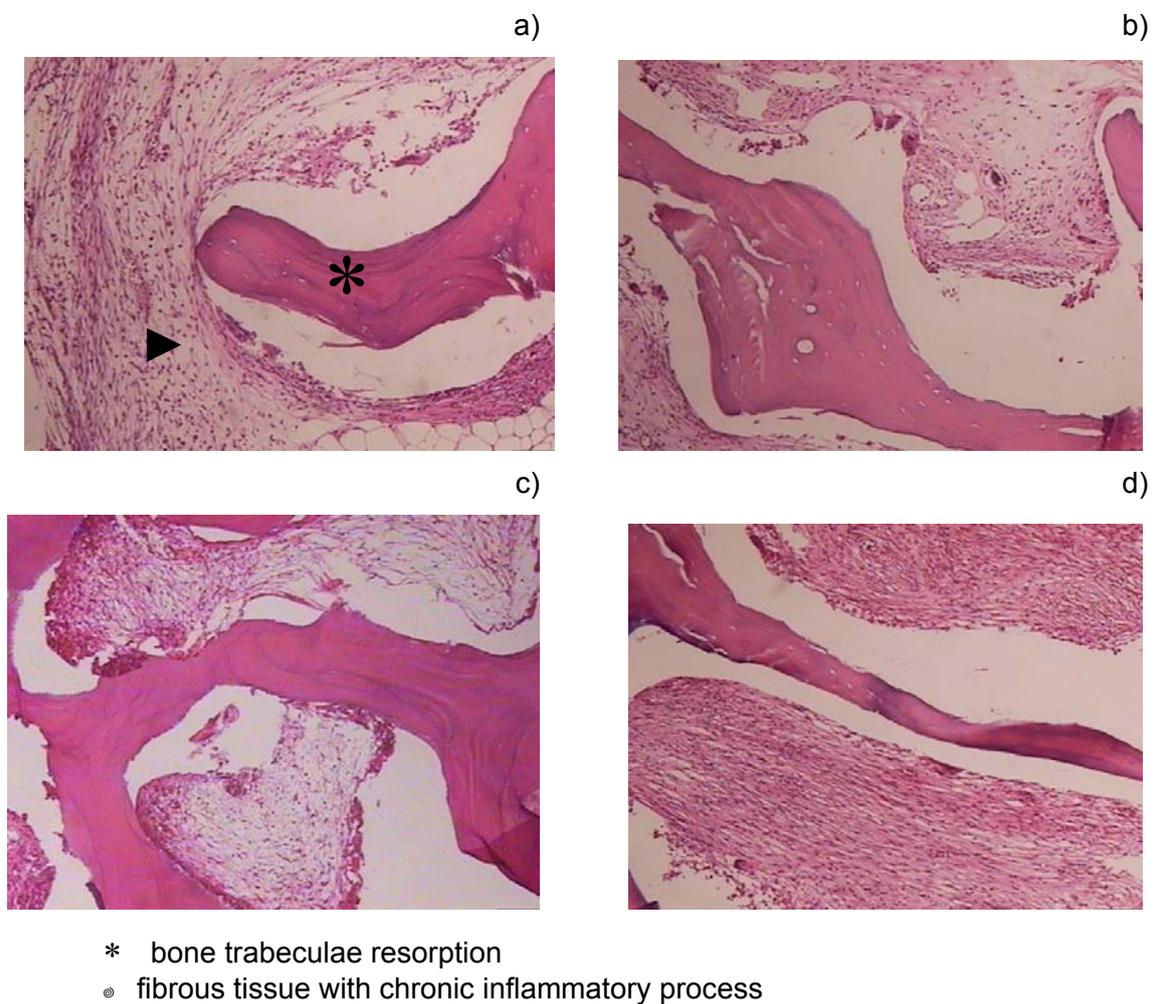


Figure 2 – Histological sections of the bone scaffolds, 5 weeks after implantation into subcutaneous site on the back. 50x magnification, HE staining. a) Group 1 – LB control; b) Group 2 – LB + MMCs; c) Group 3 – LB + MSCs; d) Group 4 – LB + MSCdif.

Table 1 – Alkaline phosphatase (ALP) activity

Group	N	Average	Standard deviation
1) LB (control)	10	1.09	0.79
2) LB + MMCs	10	1.04	0.81
3) LB + MSCs	9	0.91	0.99
4) LB + MSCdif	10	0.79	0.83

ANOVA: F=0.241; P=0.867 (NS)

LB, bovine non-demineralized lyophilized bone; MMCs, mononuclear marrow cells; MSCs; mesenchymal stem cells; MSCdif, mesenchymal stem cells differentiated in osteogenic medium.

4 DISCUSSION

An experimental model was chosen in this study to assess scaffolds obtained by bone tissue engineering with mesenchymal stem cells implanted **in a heterotopic site**. The heterotopic site model, free from the biological stimuli present in bone loss sites is appropriate to establish whether the implanted material has osteoinductive and osteogenic properties or just osteoconductive properties. The subcutaneous site on the back of mice or rats has shown to be appropriate for the development of bone tissue using stem cells in scaffolds made of hydroxyapatite and calcium phosphate ceramic^(6,17,26,27,31-33). Likewise, a post-implantation follow-up period of 5 weeks was chosen, which has shown to be appropriate in similar models^(27,31-33).

The choice to study **bovine non-demineralized lyophilized bone** as a biomaterial for bone tissue engineering takes into account its favorable qualities for clinical use, availability and acceptance in our setting. The non-demineralized lyophilized bone has an established role as a bone replacement material, with biocompatibility and biofunctionality characteristics that are favorable in the long term^(11,12,34,35). In spite of these favorable characteristics, few studies have been conducted using this material as a scaffold for bone tissue engineering. The non-demineralized lyophilized bone is considered an osteoconductive material, although some authors think it has osteoinductive properties depending on donor age^(13,35).

We think it is important to study whether the addition of mesenchymal stem cells to lyophilized bone can give this material osteogenic properties.

The cells added to implants in groups LB + MMCs (mononuclear marrow cells), LB + MSCs (mesenchymal stem cells) and LB + MSCdif (mesenchymal stem cells differentiated in osteogenic medium) encompass different phases of separation and differentiation of mesenchymal stem cells with osteogenic potential. The frequency of mesenchymal stem cells among bone marrow nucleated cells is thought to range between 1:11.300 and 1:27.000 ⁽²⁰⁾. The methods used to obtain bone marrow cells from isogenic mice, cell separation, mesenchymal stem cell culturing and their differentiation in osteogenic medium have been the subject of previous studies at the Immunogenetic Laboratory of UFRGS and results have already been published ⁽²⁰⁾. The goal of comparing cells with osteogenic potential in different phases of separation and differentiation was to check which method would provide the best results with the least *ex vivo* handling possible.

The adhesion of bone marrow cells or mesenchymal stem cells to the carrier material is an important phase for the success of bone tissue engineering. There is no consensus in literature regarding the method, quantity or time of exposure of cells to the scaffold required for cell adhesion. Different authors in successful studies on bone tissue engineering using hydroxyapatite or tricalcium phosphate ceramic ^(6,17,26,31) used conventional methods similar to those used in this study, in which cell suspension in culture medium is promoted, followed by their settling on the scaffolds. The exposure time of the cells to the scaffolds can be as short as 2 (two) hours, without compromising the results obtained in these studies ^(6,17). Mauney and coworkers ⁽⁷⁾, in a study using human bone marrow stem cells on a defatted bovine bone matrix structure, have used an initial exposure time of cells to the scaffold of 12 hours; however, this author uses a method that favors infiltration of the medium through scaffold pores through centrifugation in a bioreactor designed for this purpose. The author calls this method “dynamic cell seeding” and has shown its advantages by promoting a more homogeneous cell adhesion and their infiltration inside the bone matrix ^(7,36,37). These authors stress the importance of this phase of tissue engineering when large scaffolds are used, an essential factor for clinical applicability. In the study by Mauney and coworkers, which was successful in bone engineering using defatted bone matrices ⁽⁷⁾, scaffolds were cylinder-shaped with 6mm of diameter by 3mm thickness – sizes comparable to the bovine non-

demineralized lyophilized bone used in the present study: 8x8x2mm. The need to use more sophisticated methods to promote cell adhesion onto these scaffolds is one of the methodological aspects that can be questioned.

The results of the histological assessment 5 weeks after the *in vivo* implantation did not show any new bone formation or the presence of osteoblasts in the implants in any of the comparison groups. Alkaline phosphatase (ALP) activity results did not show any significant difference among comparison groups, with $p=0.867$; and the absolute values of alkaline phosphatase levels in the 4 comparison groups can be considered low: 0.959 on average. ALP is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of phosphate esters in alkaline pH and seems to be a prerequisite for normal skeleton mineralization⁽³⁰⁾. According to Yoshikawa (1999)⁽³⁸⁾, ALP reflects osteoblast activity, increasing as the bone turnover increases. In bone tissue engineering studies, alkaline phosphatase is produced by osteoblasts and mesenchymal stem cells since the beginning of their bone differentiation⁽¹⁷⁾, closely related to other indicators used for the same purpose, such as osteocalcin and osteopontin^(17,31,32).

In the present study, histology and ALP activity results are in agreement, since no osteoblast activity was found in the assessed samples in any of the comparison groups. Therefore, we can state that the use of mononuclear marrow cells (MMCs), mesenchymal stem cells (MSCs) or mesenchymal stem cells differentiated in osteogenic medium (MSCdif) did not give osteogenic properties to the bovine non-demineralized lyophilized bone in this experimental model and with the materials and methods used. However, for a more elucidative view of the role of non-demineralized lyophilized bone in bone tissue engineering, specific studies on each step of the process are necessary.

In bone tissue engineering, the interaction between the cells with osteogenic potential and the structural material is a recognizably complex and still poorly understood process⁽²⁵⁾. As has been discussed previously, some authors value the use of sophisticated methods to expose cells to the scaffolds, aiming at favoring their *ex vivo* adhesion^(7,36,37), considering this step fundamental for successful tissue engineering. In addition to early cell adhesion, an interaction with the material surface is required, favoring growth and cell differentiation and later the deposition of the bone matrix⁽²⁵⁾. Some studies with hydroxyapatite ceramics have shown that the microstructural characteristics of the material can influence the success of this interaction^(26,27). There is no information in literature on the process of adhesion and

interaction of mesenchymal stem cells to the surface of non-demineralized lyophilized bone. The study by Mauney and coworkers with defatted (non-lyophilized) demineralized or non-demineralized bovine bone matrices ⁽⁷⁾ showed successful adhesion and bone differentiation of mesenchymal stem cells in the *ex vivo* phase, showing successful new bone formation *in vivo* in 55% of implants. This study supports the possibility of using bovine bone matrices as a scaffold, but results cannot be generalized for the lyophilized bovine bone used in the present study due to the significant differences in the bone material preparation and differences in the method used to expose cells to scaffolds.

In addition to the proper cell-material interaction, there are other methodological aspects that are significant to achieve successful bone tissue engineering results. The surgical procedure for implantation and integration of the scaffold in the receptor site are also critical to a successful tissue engineering process. In this phase, there is a significant risk of cell loss, even if cells have been properly adhered to the bone scaffold *ex-vivo*. It has been established that even in autologous grafts lacking the immune response, only a small fraction of transplanted cells will remain viable after grafting ^(8,39). The grafting/implantation procedure triggers a response that includes the inflammatory reaction to the surgical trauma and the immune response of the host to the implant and this process is followed by the migration of host cells and the beginning of neovascularization, resulting in the formation of a fibrovascular stroma^(8,40). All cells used in this study, having been harvested from animals from the same isogenic line, can be considered genetically identical to the cells of the receptor and therefore free from immunogenicity. The implant as a whole, on the other hand, contains organic components of the lyophilized (bovine) bone donor, which are not fully eliminated by the lyophilization process used in this study, making the material immunogenic ^(8,39,40). Therefore, in the process that follows implantation, one might assume that changes in the microenvironment will occur related to the inflammatory and immune response, as well as to the early phase of neovascularization, so that the scaffold cellularity can be compromised, even after a successful initial cell adhesion.

The negative final results in this *in vivo* study do not support the initial perspective of using bovine mineralized lyophilized bone as a scaffold and cell carrier in tissue engineering with mesenchymal stem cells. But the study design does not enable us to determine what step or steps of the process were not successful; for this

reason, we cannot say that negative results are due specifically to the use of bovine non-demineralized lyophilized bone as a cell carrier. In order to elucidate the role of this material in bone tissue engineering, further studies are necessary to assess this material in other experimental models, separately exploring each methodological step that might influence the success in bone tissue engineering, from the material preparation phase, cell culture and adhesion to the material, to the surgical procedure and implantation site. Subsequent studies should include in their design the comparison with other structural materials with proven use as cell carriers, such as, for example, hydroxyapatite ceramics and tricalcium phosphate. In our view, the critical steps for bone tissue engineering that deserve special attention in subsequent studies are cell adhesion to the material in the ex vivo phase and the implant integration phase right after the surgical procedure, with the influence of the ensuing inflammatory and immune response.

REFERENCES

- 1 Almeida OM, Alonso N, Buchipiguel C, Pinheiro EA, Ferreira MC. Enxerto ósseo membranoso e endocondral: estudo comparativo e cintilográfico de perda de volume. *Rev Soc Bras Cir Plást* 1995; 10:53-8.
- 2 Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 859-74.
- 3 Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático: estudo experimental em coelhos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Univ. Federal de São Paulo; 1997.
- 4 Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2002.
- 5 Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995 Jan; 95(1): 5-20.
- 6 Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, Helbig L, Weiss S, Fellenberg J, Leo A, Simank HG, Richter W. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 26:5879-89; 2005.
- 7 Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* 10(1-2):81-92;Jan-Feb 2004.
- 8 Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res* 371:10-27;2000.
- 9 Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 27(5):911-25;1994.
- 10 Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland: experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank. *Acta Orthop Scand* 69:559-65; 1998.
- 11 Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 34(9-10):529-34;1999.
- 12 Duarte LS, Schaeffer L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Rev Bras Eng Biom* 16(2): 89-93;2000.
- 13 Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 121(10): 583-90;2001.

- 14 Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop Rel Res* 234:235-9;1988.
- 15 Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol*. 60(1):12-8; Jan 1989.
- 16 Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *ClinOrthop* 262:298, 1991.
- 17 Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S, Ohta T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69(1):128-34, Jan15, 2000.
- 18 Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* 13:81-89, 1992.
- 19 Pelissier P. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within madreporic ceramic in rats. *PlastReconstrSurg* 111(6):1932 May 2003.
- 20 Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *BrJHaematol* 123(4):702-11; Nov 2003.
- 21 Niedzwiedzki T, Drabowski Z, Miszta H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 14:115-9, 1993.
- 22 Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *JCraniofacSurg* 12(6):586-93, Nov 2001.
- 23 Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kutznetsov S, Hoyt RDVM, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *ArchSurg* 136(3):263-270, Mar 2001.
- 24 Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *ClinOrthop* 262:298, 1991.
- 25 Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *BrasJMedBiolResearch* 36:1027-36; 2003.
- 26 Habibovic P, Yuan H, Valk CM, Meijer G, Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565-3575; 2005.
- 27 Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, Yonemasu K, Hosoi H. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in*

- vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Jmater Sci:MaterMed* 17:327:336;2006.
- 28 Portinho CP, Collares MVM, Meirelles L, Silva FH, Pinto RDA, Nardi N, Pilla C, Meurer L, Edelweiss MIA, Riboldi M, Siqueira E, Morellato G, Renosto R, Sumino K. Reconstrução óssea experimental de calota craniana com enxerto de células-tronco mesenquimais. [dissertação de mestrado] Porto Alegre (RS): Curso de Pós-Graduação: Cirurgia - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
- 29 Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *JCellBiochem* 2:570-85, 1999.
- 30 Stucki U, Schmid J, Hammerle CF, Lang NP. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. A descriptive histochemical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 12(2):121-7;2001.
- 31 Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata KI, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofacial Surg* 13(2):231-39; Mar 2002.
- 32 Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carrier. *Biomaterials* 26:2501-2507; 2005.
- 33 Alan MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials* 22:1643-1651; 2001.
- 34 Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina – Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia. 2004.
- 35 Amatuzzi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop* 35(5):165-172;2000.
- 36 Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Tissue Eng.* 10(1-2):81-92;Jan-Feb 2004.
- 37 Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 14(2):193-202; Mar-Apr 1998.
- 38 Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft - bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol* 88(3):186-92;1999.

-
- 39 Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand* 70(4):374-80;1999.
- 40 Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 323:66-74;1996.

FICHA CATALOGRÁFICA:

O76m **Orsi, Victor Vieira**

Modelo experimental de retalho osteocutâneo pré-fabricado com utilização de células-tronco mesenquimais em carreador de osso liofilizado / Victor Vieira Orsi ; orient. Marcus Vinícius Martins Collares ; co-orient. Nance Beyer Nardi. – 2007.

84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

1. Células-tronco mesenquimais 2. Engenharia tissular 3. Osso 4. Liofilização 5. Desenvolvimento experimental 6. Modelos animais de doenças I. Collares, Marcus Vinícius Martins II. Nardi, Nance Beyer III. Título.

NLM: QT 25

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA