

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

MESTRADO INTERINSTITUCIONAL:

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

RECONSTRUÇÃO ÓSSEA EXPERIMENTAL DE CALOTA CRANIANA  
COM ENXERTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E FATOR  
DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL EM MATRIZ DE  
HIDROXIAPATITA E OSSO LIOFILIZADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARCELO MATTANA

ORIENTADOR:  
PROF. DR. MARCUS VINÍCIUS MARTINS COLLARES

2006

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Collares

Professor do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia – Faculdade de Medicina –  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Doutor em Cirurgia pela Universidade de Barcelona – Espanha.

Chefe da Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial – Serviço de Cirurgia Plástica –  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **Agradecimentos**

À minha esposa **Aline Camargo Regus Mattana**, pelo amor, pelo eterno apoio, cumplicidade e paciência.

À **minha família**, pelos valores e fundamentos ensinados.

Ao **Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares**, pela confiança em mim depositada, por todos os ensinamentos durante a minha formação como neurocirurgião, pela orientação e crédito; pelo modelo de médico, cirurgião, pesquisador e amigo que me estimularam a realizar este trabalho e me nortearão a vida profissional.

Ao **Ms. Cirurgião Plástico Ciro Paz Portinho**, mestrando desta linha de pesquisa, pela tua disponibilidade, pelas preciosas informações do teu brilhante trabalho, pelo teu exemplo de jovem pesquisador e tua amizade.

À **Profa. Dra. Carmen Pilla**, por toda dedicação e competência na orientação e desenvolvimento da análise bioquímica envolvida neste trabalho.

À **Profa. Dra. Luíse Meurer**, pela dedicação e entusiasmo com que realizou a avaliação histopatológica e pelos grandes ensinamentos de patologia que me proporcionou.

Ao **Prof. Dr. Renato Kalil**, que gentilmente permitiu o uso do VEGF e pela confiança depositada.

À **Ms. Geneticista Flávia Helena Silva**, pelo entusiasmo e competência, pela realização dos cultivos celulares deste trabalho e pelas idéias que me estimularam a continuar nesta linha de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos**, que produziu a hidroxiapatita utilizada no trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Galia**, responsável pelo Banco de Ossos do HCPA que fornece o osso bovino liofilizado utilizado no trabalho e na linha de pesquisa.

À **Acadêmica de Biomedicina – FEEVALE Daniela Ravizzoni Dartora**, pela dedicação e competência demonstrada durante a realização do trabalho; tua participação em todas as etapas foi de vital importância para a conclusão do projeto.

À **Profa. Ms. Paula Elisa Mattana**, pela paciência na revisão da dissertação.

Aos **funcionários do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pela competência profissional e dedicação.

Aos **profissionais estatísticos** do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, pelo apoio técnico na conclusão deste trabalho.

Aos **animais** necessários à realização deste estudo.

## ÍNDICE

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	6
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
	2.1 Objetivo Geral.....	16
	2.2 Objetivos Secundários.....	16
3.	<b>HIPÓTESE</b> .....	17
4.	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
5.	<b>MÉTODO</b> .....	29
	5.1 Delineamento.....	29
	5.2 Locais de Realização.....	29
	5.3 População.....	29
	5.4 Preparo dos Animais e Técnica Cirúrgica.....	29
	5.5 Determinação do Modelo Experimental e da Falha Crítica.....	31
	5.6 Matriz Óssea.....	31
	5.7 Grupos de Estudo.....	32
	5.8 Cultivo Celular de CT Mesenquimais Adultas de Camundongos Isogênicos C57BL/6.....	32
	5.9 Procedimento de Randomização dos Grupos de Estudo.....	33
	5.10 Análise das Amostras.....	34
	5.10.1 Análise Histológica.....	34
	5.10.2 Análise Bioquímica.....	35
	5.11 Aspectos Bioéticos.....	35
	5.12 Análise Estatística.....	35
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	37
	6.1 Análise Bioquímica.....	37
	6.2 Análise Histológica.....	37
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	39
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	42
9.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
10.	<b>LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS</b> .....	49
11.	<b>FIGURAS</b> .....	51
12.	<b>ANEXOS</b> .....	59
13.	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO EM PORTUGUÊS</b> .....	70
14.	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO EM INGLÊS</b> .....	89

## LISTA DAS ABREVIATURAS

ABS: absorbância

AE: auto-enxerto

BMP: proteína morfogenética óssea (do inglês: *bone morphogenetic protein*)

CP: Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CT: células-tronco

CT + OL: células-tronco com matriz de osso liofilizado

ET: engenharia tecidual

EUA: Estados Unidos da América

FA: fosfatase alcalina

FGF: fator de crescimento de fibroblastos (do inglês: *fibroblast growth factor*)

GPPG: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HA: hidroxiapatita

HE: hematoxilina-eosina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

MEC: matriz extracelular

MNF: matriz neoformada

MO: medula óssea

Mrad: milirad(s)

MSO: materiais de substituição óssea

Nm: nanômetros

OC: osteoclastos.

OL: osso liofilizado

PDGF: fator de crescimento plaquetário (do inglês: *platelet-derived growth factor*)

PLA: ácido polilático

PLAGA: ácido polilático glicólico

PD: polpa dentária

TC: tomografia computadorizada

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial (do inglês: *vascular endothelial growth factor*)

## 1. INTRODUÇÃO

A trepanação do crânio é considerada um dos mais antigos procedimentos cirúrgicos. Crânios retirados dos cemitérios de Paracas e Pachamac, no Peru, mostram que essa intervenção já era realizada pelos Incas em 3000 a.C.. Pedacos de ouro e prata com o mesmo tamanho dos buracos das trepanações foram achados nos cemitérios junto aos crânios trepanados, indicando que essas peças metálicas representam as primeiras tentativas de realização de cranioplastia por humanos. Naquela época, as trepanações tinham um papel místico. Acreditava-se que, abrindo o crânio, os maus espíritos podiam ser retirados daquele indivíduo. Um dos pioneiros da neurocirurgia, o francês Pierre Paul Broca, em 1861, foi o primeiro a interpretar as perfurações nos crânios incas pré-colombianos como sendo praticadas cirurgicamente (Youmans, 2003; Gusmão, 2000; Schmidek, 2000).

Na prática neurocirúrgica, a craniotomia é etapa fundamental do procedimento cirúrgico. É por meio dela que o conteúdo encefálico é acessado. Wagner, em 1889, descreveu a craniotomia osteoplástica nos moldes como é realizada até hoje (Gusmão, 2000). A evolução das técnicas operatórias e dos materiais cirúrgicos disponíveis aponta para uma tendência em buscar realizar abordagens invasivas cosmeticamente imperceptíveis. Muitas das situações médicas que levam pacientes às cirurgias neurológicas têm uma grande probabilidade de cura com o procedimento cirúrgico ou, pelo menos, de uma sobrevida expressiva com boa qualidade de vida. É principalmente em situações como esta que o neurocirurgião, ou qualquer outro profissional que atue na área, deve buscar alternativas para tentar minimizar os eventuais danos na solução de continuidade da calota craniana, produzindo um resultado cosmético funcional e favorável.

O crânio tem a função básica de estojo protetor do encéfalo e, em situações de falha óssea da caixa craniana existe o risco aumentado de traumatismo encefálico, normalmente resultando em um grave defeito estético. Dentre as diferentes causas de falhas ósseas no crânio o trauma pode ser apontado como a mais freqüente, seguido das craniotomias descompressivas, infecções, neoplasias e defeitos congênitos (Youmans, 2003).

As tentativas de reconstrução da calota craniana vêm evoluindo ao longo da história da Medicina. Fallopius, em 1600, descreveu que o osso deveria ser usado

como material para o reparo dos defeitos cranianos ocasionados por trepanações, e para o reparo dos defeitos secundários produzidos por trauma deveria ser usado o ouro. Van Meeken, em 1670, corrigiu um defeito craniano com osso canino, tendo que depois retirar o enxerto por exigência da Igreja. O uso de materiais aloplásticos para cranioplastia teve seu início na prática da neurocirurgia durante a Segunda Guerra Mundial, com a introdução do uso do tântalo e do metilmetacrilato para reparar falhas ósseas cranianas, sendo este último o material mais utilizado para cranioplastia ainda atualmente (Youmans, 2003).

A literatura está repleta de estudos clínicos e laboratoriais (Delacure, 1994; Ferreira, 1997; Silva, 2000; Conrad, 1993; Lemperle, 1998; Deluca, 1997; Isaksson, 1992; Ozaki, 1999; Perry, 1999) que mostram a superioridade dos enxertos membranosos e as vantagens da utilização de osso isotópico, que se adapta melhor ao sítio receptor (Fukuta, 1992).

O osso autógeno é freqüentemente utilizado como enxerto para reparar defeitos cranianos. Sua sobrevivência como enxerto depende da invasão de capilares e osteoblastos do osso receptor. O enxerto, quando colocado no local receptor, é rodeado por sangue e a resposta inflamatória inicia. Capilares diplóicos do osso circunjacente, da dura-máter e do escalpo se infiltram no leito transplantado durante a primeira semana após a cirurgia. Durante a segunda semana, ocorre a proliferação do tecido de granulação fibroso e atividade osteoplástica. O leito vascular invade o enxerto ósseo e as células mesenquimais primitivas se diferenciam em células osteogênicas. Essas células osteogênicas se diferenciam em osteoblastos, que revestem as bordas das trabéculas mortas e depositam osso novo. As áreas de osso necrosado cercado são gradualmente reabsorvidas e substituídas por osso novo. O contato funcional entre o osso transplantado e a díploe receptora, associados a uma fixação firme favorecem a integração do transplante. Contrariamente, se o osso autógeno for colocado em gordura ou músculo e ficar sem contato funcional com osso circunjacente, ele provavelmente será reabsorvido. A integração do enxerto é influenciada pela fixação óssea, pela substituição da dura máter, por aplicação de cera óssea na díploe circunjacente e vascularização do escalpo.

A colocação de um enxerto ósseo num defeito craniano é uma situação similar a uma craniotomia osteoplástica devido ao interrompimento total de aporte sangüíneo. O retalho ósseo reimplantado numa craniotomia e um enxerto ósseo de



qualquer natureza são percebidos pelo organismo como um corpo estranho. Se o enxerto ósseo permanecer sem vascularização, ele será encapsulado e reabsorvido. O risco de infecção aumenta e existe a eventual necessidade de retirada do implante. No entanto, quanto mais o implante for vascularizado a partir do osso circunjacente, mais resistente à infecção ele se torna (Youmans, 2003).

Diferentes estudos têm sido feitos no intuito de procurar materiais de substituição óssea (MSO) adequados. Em situações de extenso déficit ósseo, ou mesmo em situações que se buscam diminuir o tempo e a morbidade cirúrgica, alternativas vêm sendo buscadas. Os requisitos para um MSO ideal são: estimular a regeneração e a consolidação óssea, proporcionar resistência fisiológica, permanecer observável (ter contraste radiográfico), ser obtido prontamente, ser fácil de usar, não causar reação inflamatória em tecidos adjacentes, não levar à encapsulação de tecido conjuntivo, não desencadear transformação maligna, não produzir subprodutos tóxicos, não ter propriedades galvânicas ou eletrolíticas e não proporcionar mecanismos facilitadores de infecções (Sailer, 2000).

Uma possibilidade atual é a utilização de material proveniente de bancos de tecidos. Na última década, o uso clínico de homoenxertos ósseos atingiu 355.000 casos por ano (Jinno, 2000). Destes, estima-se que 200.000 são para uso médico e o restante para uso odontológico (Zasacki, 1991). Aproximadamente entre 10% a 15% das cirurgias ortopédicas realizadas nos EUA a cada ano envolvem alguma forma de enxerto ósseo (referido por Macedo, 1999).

Os xenoenxertos bovinos são correntemente comercializados como material inerte, livre de antígenos, porém têm apresentado respostas insatisfatórias (Fukuta, 1992).

Os biomateriais da hidroxiapatita (HA) são osteocondutivos, mas não intrinsecamente osteoindutivos. Esses materiais são biocompatíveis. Apresentam, contudo, um desempenho biofísico inadequado em termos de remodelação, podendo haver migração, deiscência, ulceração e extrusão. A ossificação com esses materiais costuma ocorrer nos limites da zona receptora, sem migração para as áreas mais internas do enxerto (Ferreira, 1997). Este parece ser um limite de integração e regeneração a ser estudado e transposto com novas técnicas, como a associação de culturas celulares (Fukuta, 1992).

A liofilização para preservação de enxertos ósseos não parece afetar de forma adversa a capacidade osteoindutiva do transplante. Ela pode, entretanto,

alterar significativamente a biomecânica desses enxertos, caso for utilizada como implantes estruturais (Macedo, 1999; Conrad, 1993; Perry, 1999). Seus resultados, em modelos experimentais, têm sido inferiores ao osso autógeno (Cheng, 2005).

Uma das tarefas de quem utiliza procedimentos de enxerto ósseo é escolher o enxerto correto para o meio biológico e mecânico aonde ele vai ser colocado (Stevenson, 1996). A escolha do processo de armazenamento a ser utilizado deve levar em consideração aspectos práticos e econômicos, com o máximo de segurança possível para os pacientes. O cirurgião é obrigado a estar familiarizado com as propriedades dos vários materiais de enxertia óssea disponíveis, seu desempenho, indicações, contra-indicações e risco de transmissão de doenças (Macedo, 1999).

Atualmente, pesquisadores de uma área recente de investigação biomédica denominada engenharia tecidual (ET), estudam novas formas de produção tecidual, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (Chang, 2003). A ET é um campo multidisciplinar e compreende todos os métodos e esforços para projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos específicos em locais específicos (Goessler, 2005). A manipulação poderá ser de células, matrizes ou de estímulos biológicos (Muschler, 2002).

Os princípios biológicos que embasam a ET tornaram-se um campo de grande interesse na pesquisa biomédica. As pesquisas em ET cresceram de maneira vertiginosa nos últimos dez anos, uma vez que se descobriu que há grande potencial para a regeneração e fabricação de tecidos (Goessler, 2005).

As técnicas de ET, combinadas à terapia gênica, podem melhorar a osteogênese e a fabricação de enxertos ósseos. Mais importante do que isso, a ET está se tornando uma realidade clínica.

A ET envolve fundamentalmente duas etapas:

1. a manipulação *ex vivo* de células autógenas, sua expansão, diferenciação e introdução em estruturas ordenadas superiores (como por exemplo uma matriz óssea mineral pré-moldada), que são reintroduzidas nas regiões lesadas e integradas no processo de regeneração;
2. a introdução de estruturas supramoleculares nas regiões lesadas, semelhantes aos elementos de matriz extracelular (MEC) e mediadores intercelulares associados, facilitando a mobilização, a expansão e integração de populações de células

regenerativas, fomentando o reparo, regeneração e renovação de tecidos e órgãos degenerados (biomimética).

Nos últimos anos, o conceito do uso potencial das células-tronco (CT) de origem embrionária ou de organismo adulto introduziu novas perspectivas em tratamento celular de patologias teciduais (Jones, 2004).

O termo “células-tronco” descreve um tipo celular não-especializado, que pode renovar-se e manter-se por um período longo de tempo com o potencial de derivar para uma linhagem celular ou tecidual com funções especializadas (Conrad, 2005). Em 1981, publicações na área de cardiologia apresentaram o isolamento de CT embrionárias murinas e sua utilização para a produção de cardiomiócitos (revisado em Passier, 2005). Em 1997, a clonagem de um mamífero, a ovelha Dolly, trouxe um novo estímulo para a pesquisa de CT e à medicina regenerativa (revisado em Sylvester, 2004).

As CT mesenquimais já foram denominadas células estromais ou de sustentação da medula óssea (MO), pois pareciam surgir de uma matriz complexa de estruturas encontradas neste órgão. Sua função era restrita a servir de camada de suporte para as CT hematopoiéticas (Pereira, 1998). Pesquisas da última década, porém, evidenciaram que as CT mesenquimais têm funções muito mais importantes (Sylvester, 2004). Elas são capazes de se diferenciar em qualquer linhagem mesenquimal e também de sofrer um processo de transdiferenciação celular a outras linhagens, como a de células nervosas – que têm origem ectodérmica (Batouli, 2003; Conrad, 2005; Meirelles, 2003).

As CT podem ser utilizadas como terapia celular para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos (Sylvester, 2004). A possibilidade de cultivo de CT embrionárias humanas a partir de blastocistos obtidos por fecundação *in vitro*, permitiu propor transplantes de CT embrionárias totipotentes em tecidos degenerados, conseguindo uma regeneração *in situ* com populações celulares funcionais.

Tanto as CT embrionárias como as adultas são fontes potenciais para aplicações clínicas futuras (Passier, 2005). Parece haver uma vantagem das CT embrionárias pelo fato de que elas podem ser mantidas indiferenciadas indefinidamente. Contudo, sua segurança em termos de formação de um teratocarcinoma ainda requer muita cautela e vários estudos.

A questão ética também tem sido uma grande barreira à realização de novas pesquisas com CT, uma vez que, ao se determinar que o embrião já é um ser

humano, o procedimento de aquisição das CT embrionárias seria considerado abortivo. Em nível clínico, sua utilização não é permitida, em função destes aspectos. As pesquisas com CT embrionárias estão autorizadas em alguns países, com base em requerimentos distintos. No Brasil, é possível utilizar linhagens já estabelecidas ou embriões não utilizados em clínicas de fertilização. Entretanto, isso enquadra a pesquisa em nível pré-clínico no País. As CT adultas, contudo, têm sido empregadas há algum tempo em protocolos clínicos.

A utilização de CT adultas pode ser uma via alternativa promissora à utilização de CT embrionárias e seus entraves. Foi demonstrado que o organismo adulto possui reservas de CT (conforme é possível visualizar na Figura 1) e a fonte mais rica é a medula óssea (MO), cujas CT mostram a capacidade de diferenciação praticamente pluripotente, incluindo (em modelos animais) uma capacidade de diferenciação em uma ampla gama de células de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica (Pittenger, 1998). Como essas células podem ser facilmente colhidas e potencialmente cultivadas *ex vivo*, este novo conceito abre amplas possibilidades de seu uso em medicina regenerativa, nos sistemas autólogos e, portanto, não apresentando problemas de rejeição imunológica.

Muitos esforços têm sido feitos para isolar e definir o tipo celular que deriva da MO e leva à formação de adipócitos, condrócitos e osteoblastos (Sylvester, 2004). Os clones de CT mesenquimais são difíceis de ser gerados e, por isso, essas células costumam ser isoladas por sua tendência de aderir firmemente a placas de cultivo (Pittenger, 1999).

Além das CT medulares, outros tecidos guardam uma reserva considerável de células pouco diferenciadas, com alta capacidade de regeneração (Sonoyama, 2005). As células-satélites de fibras musculares esqueléticas são um dos exemplos clássicos. Estudos recentes mostraram que, embora engajadas em uma via de diferenciação, essas células podem ser induzidas ao processo de transdiferenciação celular como, por exemplo, na obtenção de condroblastos e osteoblastos (Batouli, 2003; Gronthos, 2001). Esses resultados abrangem uma perspectiva muito ampla para a medicina regenerativa, uma área de estudo em crescimento franco.

A indução da diferenciação – aplicada à área de regeneração óssea – pode ser feita apenas colocando-se a CT mesenquimal em meios apropriados de cultivo, considerados osteoindutores.

O estágio de diferenciação celular pode ser inversamente proporcional à capacidade da célula em promover regeneração se cultivada. Já está comprovado que osteoblastos bem diferenciados perdem suas propriedades fenotípicas e regenerativas durante períodos de cultivo, enquanto que células pouco diferenciadas do periósteo podem manter seu potencial de regeneração e de diferenciação quando cultivadas (Nakahara, 1990).

Faz-se necessário, assim, a compreensão de: auto-renovação celular, diferenças entre mitoses simétricas e assimétricas, estabelecimento de linhagens, condições de cultivos celulares, sinais indutivos, fontes potenciais de células e interações entre células e matrizes extracelulares (MEC) (Ge, 2004; Hanks, 2004; Meirelles, 2003). A adição de fatores de crescimento e outras substâncias pode melhorar a regeneração e a integração de enxertos ósseos contendo CT (Ozturk, 2005).

A atuação da ET pode ser revolucionária na produção de enxertos ósseos. Talvez seja possível a utilização de grandes quantidades de osso autógeno por meio da associação de cultivos celulares associados à MSO. A área doadora para estes casos poderia ser uma pequena amostra tecidual, ou mesmo um pequeno número de células. Além disso, o planejamento e a moldagem (prototipagem) do enxerto podem ser aperfeiçoados e melhor utilizados.

A utilização de CT pode ser associada também a outras técnicas de promoção, regeneração e reconstrução óssea, como a distração osteogênica (Kitoh, 2004).

A interação entre as células cultivadas e as matrizes ósseas tem sido um outro ponto de estudo (Hanks, 2004). A MEC medeia a adesão celular a biomateriais. No osso, a MEC é composta de proteínas, tais como colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina, osteopontina e osteonectina. Além da possibilidade de estudo da adesão, estes elementos podem ser avaliados como indicadores da regeneração tecidual (El-Amin, 2003).

Sabe-se que osteoblastos que não expressam proteínas de adesão – como as integrinas, por exemplo – e que não se aderem à MEC circunjacente sofrem apoptose.

Alguns estudos utilizando abordagens experimentais distintas, estabeleceram que as culturas de CT mesenquimais contêm estágios distintos de diferenciação. O

estímulo do microambiente pode provocar a diferenciação dessas células em osteoblastos (Minguel, 2001).

É necessário estudar com mais profundidade as propriedades biológicas das CT adultas, no sentido de esclarecer melhor o mecanismo de ação relacionado à diferenciação celular, bem como o tipo ideal a ser empregado em protocolos clínicos. Assim, novos estudos deverão ser feitos nas mais diversas áreas biomédicas. No caso das reconstruções ósseas, é preciso compreender também a interação entre as células e as matrizes ósseas ou seus substitutos (Passier, 2005).

O processo de angiogênese ocorre em diferentes estágios que, resumidamente, compreendem: dilatação do vaso, ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas, secreção de ativadores do plasminogênio e enzimas proteolíticas, desgranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, ruptura da membrana basal e aumento de permeabilidade com saída de fibrina e outras proteínas (estágio 1). Em seguida, ocorre formação de pseudópodos, degradação da matriz extracelular, migração de células endoteliais para o espaço extravascular com proliferação das mesmas e formação de brotos de tecido vascular (estágio 2). Por fim, forma-se nova membrana basal e maturação da nova parede vascular para estabelecimento do fluxo sanguíneo, formação de tubos e conexões, estabelecendo-se os novos vasos (estágio 3).

O processo pelo qual a hipóxia e a inflamação induzem à angiogênese está parcialmente esclarecido. Já se sabe que a inflamação aumenta a produção do peptídeo derivado de macrófagos PR-39. Este inibe a degradação de HIF-1alfa (hypoxiainducible factor 1 alfa), levando ao aumento da expressão de VEGF (vascular endothelium growth factor), seus receptores Flt1 e Flk1 e da sintetase de óxido nítrico (eNOS). Por outro lado, o PR- 39 aumenta a produção de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais têm poder angiogênico. Ainda por outro caminho, a inflamação induz a produção de citocinas promotoras de angiogênese.

As duas famílias de fatores mais bem estudados que participam do processo descrito são as de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e as de fator de crescimento fibroblástico (FGF). O membro melhor identificado da família VEGF é VEGF-A, que consiste de 5 isoformas, resultantes de divisões alternativas de um gen único, ou seja: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 206. A família FGF compreende pelo menos 9 polipeptídeos, incluindo FGFbásico e

FGFácido. Diferentemente do VEGF, o FGF atua na mitogênese de células endoteliais, de fibroblastos e de células musculares lisas (Kalil, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a capacidade de integração e regeneração de enxertos ósseos, contendo CT mesenquimais indiferenciadas, enriquecidas ou não de VEGF.

### **2.2 Objetivos Secundários**

Comparar diferentes materiais de substituição óssea contendo CT mesenquimais indiferenciadas enriquecidas ou não de VEGF.

Mensurar a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) na reconstrução com CT enriquecidas ou não de VEGF.



### **3. HIPÓTESE INFERENCIAL OU DE PESQUISA ( $H_1$ )**

A regeneração óssea de falhas de calota craniana apresenta maior qualidade bioquímica e histológica quando a matriz inorgânica utilizada é a HA acrescida de CT mesenquimais e é maior ainda quando enriquecida com VEGF.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Macewen (Perry, 1999), em 1880, foi pioneiro ao descrever o uso do homoenxerto como forma de reconstituir o tecido ósseo. No procedimento, ele utilizou com sucesso a tíbia de uma criança para reconstruir o úmero de um menino de quatro anos. A base científica do transplante ósseo foi estabelecida na metade do século XIX, com as observações feitas por Ollier, em 1867, sobre as propriedades osteogênicas do osso e do perióstio (Volpon, 2000).

Sailer (2000) descreveu as características de um material de substituição óssea (MSO) ideal. Os vários tipos de biomateriais podem ser tanto incorporados no interior do tecido ósseo do hospedeiro, quanto substituídos por tecido ósseo. A conversão completa do material de preenchimento em osso autógeno pode ser esperada somente após um período de dois anos.

Delacure, em 1994, publicou uma revisão sobre os mecanismos fisiológicos da cicatrização óssea. Ele cita que a compreensão desses processos permite escolher com maior clareza técnicas e sítios doadores, aproveitar mais adequadamente o volume de enxerto retirado, alcançar resultados mais consistentes e direcionar melhor o processo cicatricial ósseo.

Ozaki e Buchman (1998) estudaram a manutenção de volume ósseo de enxertos, comparando enxertos corticais e medulares. Foram realizados enxertos ósseos em vinte e cinco coelhos *Nova Zelândia* e em cada crânio de coelho foram colocados enxertos corticais de osso membranoso e enxertos corticais e medulares de osso endocondral. Os animais foram sacrificados com três, oito e dezesseis semanas de pós-operatório. A análise de volume por tomografia computadorizada (TC) demonstrou uma reabsorção significativamente maior no osso medular endocondral do que no cortical, independente de ele ser membranoso ou endocondral ( $P < 0,05$ ). Isso ocorreu nos três tempos de avaliação. Entre os dois últimos, não houve diferença significativa. Considerando os resultados obtidos, os autores acreditam que o osso cortical pode ser superior no que diz respeito à manutenção de volume após enxertos.

Esses mesmo autores (Ozaki e cols., 1999) estudaram, posteriormente, a micro-arquitetura de enxertos corticais de origens embrionárias diferentes – membranosa *versus* endocondral. O trabalho também foi realizado com coelhos *Nova Zelândia*, divididos em dois grupos e sacrificados após o mesmo período: três,

oito e dezesseis semanas de pós-operatório. Um enxerto de cada origem foi colocado no plano subperiosteal desses animais. A análise por TC e histomorfometria não demonstrou diferenças estatísticas entre: volume, número médio de trabéculas e medidas de anisotropia. Houve, no entanto, diferenças significativas entre as aferições com três e com dezesseis semanas. Os dois trabalhos publicados por esses autores desafiaram alguns conceitos prévios sobre as diferenças biológicas de enxertos ósseos de origens diferentes.

Lemperle e cols. (1998), analisaram a regeneração óssea espontânea, a osteocondução e os auto-enxertos medulares em falhas de calota craniana e mandíbula em cães. Após dois e quatro meses de colocação, os enxertos foram retirados e avaliados. No modelo de falha mandibular, houve maior formação de osso na falha sem enxerto (47,3%), seguido do grupo com auto-enxerto (34,8%) e do grupo com implantes de hidroxiapatita (HA) (19,0%). No modelo de calota craniana, o tratamento com auto-enxerto demonstrou maior formação óssea (27,3%), seguido do grupo sem tratamento, que foi similar ao grupo com implantes de HA (18,2%). No modelo de mandíbula, uma tela de titânio foi utilizada para impedir a penetração de tecidos moles na falha. Assim, o efeito osteogênico do perióstio conseguiu promover o fechamento da falha. Os autores enfatizaram a necessidade de diferenciar falhas críticas que contenham ou não proteção e perióstio, uma vez que estas podem ser consideradas variáveis fundamentais na osteogênese.

Stevenson (1996) apresentou uma revisão sobre fatores que afetam a integração dos enxertos ósseos. Segundo o autor, o enxerto, para sua revascularização, é dependente do tecido circunjacente, e isso resulta em atraso na penetração vascular. Quando células histocompatíveis são adicionadas ao enxerto, a velocidade de regeneração e integração parece aumentar.

Isaksson e cols. (1992) estudaram as diferenças entre enxertos homogêneos membranosos e endocondrais. Após produzirem falhas na calota craniana de coelhos adultos e reconstruí-las com ambos os tipos de enxerto (liofilizados), os estudos provaram não haver diferenças significativas entre eles, e o potencial osteoindutivo foi baixo.

Zasacki (1991) fez uma análise retrospectiva de cirurgias ortopédicas nas quais foi utilizado osso liofilizado (OL) esterilizado com radiação. De 435 amostras analisadas, houve resultados satisfatórios em 394 pacientes (91%).

Deluca e cols. (1997) observaram a perda de volume em enxertos ósseos. Em um modelo animal com coelhos *Nova Zelândia*, compararam o volume de enxertos frescos contra enxertos preservados em solução salina e antibióticos por três meses. O primeiro grupo apresentou manutenção de 85,1% do volume inicial, enquanto que o segundo, entre 61,8 e 75,9% do mesmo. Os pesquisadores concluíram que o osso fresco permanece como padrão-ouro para enxertias, mas que outros enxertos preservados podem ser alternativas viáveis.

Lohmann e cols. (2001) pesquisaram o efeito da desmineralização no potencial osteoindutivo de enxertos ósseos humanos em dois grupos de pacientes. No primeiro grupo, havia pacientes com menos de 42 anos e, no segundo, com mais de 70 anos. O material retirado foi liofilizado e dividido em duas porções: uma foi usada diretamente, e a outra desmineralizada. Foi criado um escore para classificar os enxertos, baseado no número e tamanho dos ossículos formados. Além disso, a área de osso neoformado foi determinada por histomorfometria. A resposta tecidual ao enxerto variou com a idade do doador e dependendo de ser ou não desmineralizado. O enxerto desmineralizado de pacientes jovens apresentou propriedades osteoindutivas. O enxerto de pacientes idosos, desmineralizado ou não, gerou tecido conjuntivo denso e fibroso.

Macedo e cols. (1999) compararam a resistência à compressão entre osso bovino congelado e liofilizado. Três grupos foram analisados: o primeiro, formado por cilindros de osso congelado, posteriormente descongelados, durante uma hora; o segundo, formado por cilindros de OL e reidratado durante o momento do teste; e o terceiro, por fim, formado por cilindros de OL e reidratado durante uma hora e meia antes do teste. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas avaliações biomecânicas de deformação, nem na carga máxima de compressão, nem na razão de deformação. Os pesquisadores salientaram também que estes resultados foram realizados *in vitro* e que negligenciam, conseqüentemente, os processos biológicos aos quais o osso é submetido *in vivo*.

Fukuta e cols. (1992) compararam a reconstrução de falhas de espessura total da calota craniana em coelhos. Eles demonstraram que tanto o pó de osso autógeno, grânulos de HA porosa ou partículas de osso mineral bovino geram regeneração na calota craniana. No entanto, a quantidade de osso gerada com material autógeno foi significativamente maior.

Alberius e cols. (1990) detectaram que as suturas cranianas têm um comportamento biomolecular diferente das outras regiões do osso craniofacial.

Cheng e cols. (2005) examinaram modelos ovinos para reconstrução óssea por engenharia tecidual (ET). Eles compararam osso autólogo com OL. O primeiro grupo apresentou mais volume e mais formação óssea após nove semanas, embora continuasse a haver remodelamento e diminuição volumétrica de ambos.

Schwartz e cols. (1996) observaram a capacidade osteoindutiva de enxertos de OL. Foram realizados implantes intramusculares e subcutâneos. Após quatro e oito semanas, tais implantes foram retirados para exame. Nas amostras de colocação intramuscular houve neoformação óssea, ao contrário do que aconteceu nas amostras de colocação subcutânea.

Conrad e cols. (1993) estudaram o efeito da liofilização e da reidratação no osso medular. A partir de uma análise de ossos de cadáveres, foi possível determinar que o processamento ósseo diminui a força e a resistência óssea.

Oliveira e cols. (2002) compararam a reconstrução óssea de calota craniana em ratos não-isogênicos. Eles demonstraram que o enxerto autólogo fresco foi a melhor opção na reparação do esqueleto craniofacial. Embora os enxertos homólogos tivessem apresentado resultados satisfatórios, com capacidade de osteoindução e osteocondução, os enxertos homólogos liofilizados pareceram ter um melhor comportamento em longo prazo.

Jinno e cols. (2000) estudaram os efeitos da utilização de radiação gama em baixas doses (1,5 Mrad) em enxertos ósseos corticais singênicos e homólogos. Nem o processamento, nem a radiação afetaram significativamente a integração dos enxertos, independente de serem singênicos ou homólogos. Após seis meses, a resistência dos dois enxertos foi similar. Assim, neste estudo, a radiação não comprometeu as propriedades biológicas dos enxertos ósseos.

Silva e cols. (2000) compararam retalhos ósseos pré-fabricados com osso homogêneo liofilizado e congelado. O grupo com OL demonstrou maior perda da arquitetura e da rigidez.

Nakahara e cols. (1990) examinaram células do periosteio de frangos e demonstraram que esse tecido tem precursores que podem diferenciar tanto a osteoblastos como a condrócitos. As células bem diferenciadas, como os osteoblastos, perdem suas propriedades fenotípicas durante o período de cultivo,

enquanto que outras menos diferenciadas, como as do periósteo, mantêm tais propriedades.

Passier e Mummery (2005) revisaram e compararam a utilização de CT embrionárias e adultas para diferenciação a cardiomiócitos. Uma das primeiras áreas a utilizar CT para diferenciação e tratamento foi a cardiologia. Os cardiomiócitos não têm capacidade para reparar áreas extensas do coração, a não ser que novas células dessas sejam transplantadas. A partir disso, foram iniciadas novas pesquisas para obter fontes de cardiomiócitos. Essas pesquisas estenderam-se também a outras linhagens, como a de células ósseas e precursoras. As CT embrionárias têm a vantagem de serem mantidas indiferenciadas indefinidamente e são de fácil obtenção, ao passo que as adultas têm menor risco de formação de neoplasias e problemas éticos.

Silva (2005) determinou métodos de separação de CT mesenquimais de aspirados medulares, cultivo e expansão de culturas *in vitro*.

Muschler e Midura (2002) revisaram conceitos e aplicações de células progenitoras do tecido conjuntivo. Apresentaram aspectos sobre a biologia celular das CT, incluindo auto-renovação, mitoses simétricas e assimétricas e restrição de linhagens. A eficácia de enxertos ósseos depende inteiramente das células na área receptora, particularmente das CT e das células progenitoras, capazes de gerar um novo tecido.

Minguell e cols. (2001) publicaram uma revisão sobre estudos realizados *ex vivo* a respeito das CT derivadas da MO. Apesar do grande conhecimento que veio à tona nas últimas décadas, tanto em nível molecular como celular, ainda existem questões fundamentais em análise para determinar a eficácia e a segurança da utilização de CT em terapia gênica e celular.

Sylvester e Longaker (2004) fizeram uma importante revisão sobre as CT e sua utilidade potencial em cirurgias reparadoras. Eles apontam diferenças entre as CT embrionárias e as adultas ou somáticas pós-natal. Embora as primeiras tenham maior potencial para produzir novos tecidos, esbarram nas questões de segurança e de ética. Assim, as CT adultas ganharam muita importância no estudo da ET. Os autores destacam o potencial das CT mesenquimais, que outrora foram tidas apenas como células de sustentação da MO (células estromais ou de suporte).

Conrad e cols. (2005) publicaram uma revisão sobre a utilização das CT adultas em medicina regenerativa e em cirurgia reparadora. Eles citam que tais

células apresentam a propriedade de diferenciação em outros tecidos, uma característica definida como plasticidade. Além disso, elas podem sofrer transdiferenciação, uma propriedade que permite que, mesmo estando comprometidas com uma via (*committed*, em inglês) – que pode ser a mesenquimal, produzindo músculo, por exemplo –, podem passar a outra via – como a ectodérmica, produzindo células do tecido nervoso. Esses autores também afirmam que uma das dificuldades atuais com pesquisa de CT é o isolamento de uma quantidade suficientemente numerosa e pura dessas células.

Um dos problemas das CT, principalmente as mesenquimais, é a questão de não expressar antígenos específicos de tecidos (lin<sup>-</sup>). Outra característica peculiar é que as CT adultas não podem ser localizadas em uma região específica de um órgão (nicho), mas estão dispersas por todo esse órgão (ou tecido), com frequência e estado de atividade muito variáveis.

Lucarelli e cols. (2004) também revisaram a possibilidade de reconstruções ósseas com CT. Eles destacam a importância das CT autógenas adultas que facilitam as questões éticas e não requerem imunossupressão. Os autores também apresentam duas abordagens pré-clínicas que precisam ser estudadas: as CT da MO e as de outros tecidos. Assim, novas fontes podem ser consideradas e eleitas para técnicas de ET óssea.

Goessler e cols. (2005) publicaram uma revisão sobre ET, suas definições e potenciais. Citam que o sucesso de qualquer estudo nesta área deriva fundamentalmente do conhecimento de uma unidade: a célula. As CT surgem como um dos principais arsenais na reconstrução e reparo de tecidos nessa nova área.

Pittenger e cols. (1999) apresentaram uma publicação sobre a potencialidade das CT mesenquimais. Essas células contribuem para a regeneração do osso, da cartilagem, dos músculos, ligamentos, tendões, tecido adiposo e do estroma. Tais células podem ser cultivadas, baseadas em suas propriedades de aderência a superfícies.

Um estudo utilizou CT mesenquimais de oito ovelhas para reparo craniano de defeitos ósseos (Shang, 2001). Foram criados defeitos bilaterais de 20mm de diâmetro (espessura total) nesses animais. Esses defeitos foram reparados por implantes ósseos de CT (n=8) ou com alginato de cálcio sem CT (n=4). Um grupo controle (n=4) não teve reparação. Houve crescimento ósseo considerável após seis semanas nos dois grupos de intervenção, mas não no grupo-controle. O osso

cultivado por ET tornou-se mais maduro após 18 semanas de pós-operatório. A avaliação tomográfica demonstrou reparação quase completa após esse período.

Dong e cols. (2002) analisaram a implantação de blocos de HA contendo CT mesenquimais da MO em tecido subcutâneo de ratos singênicos. Após 13 semanas da cirurgia, foi evidenciado que a superfície porosa da matriz estava coberta com osteoblastos e colágeno. Com 26 semanas, a concentração desses elementos era maior, assim como a quantidade de osso formado.

Ge e cols. (2004) avaliaram a interação entre HA com vários graus de hidratação e com CT mesenquimais induzidas a osteoblastos. Eles demonstraram regeneração óssea nas áreas implantadas, não só pelas células do enxerto, mas também da área circunjacente.

El-Amin e cols. (2003) realizaram um estudo para avaliar a produção de matriz extracelular (MEC), organização do citoesqueleto e adesão de osteoblastos a matrizes biodegradáveis para ET, denominadas ácido polilático glicólico (PLAGA) e ácido polilático (PLA). Eles examinaram a adesão celular a essas matrizes após três, seis e 12 horas. Os autores determinaram que os osteoblastos colocados no PLAGA aderiam melhor, produzindo maior quantidade de MEC.

Hanks e Atkinson (2004) observaram a interação entre célula e MEC no tecido ósseo. Eles compararam duas matrizes ósseas inorgânicas liofilizadas, sendo que uma continha o peptídeo P-15, que é derivado da molécula do colágeno tipo I. No grupo onde o P-15 estava presente, a adesão foi significativamente maior.

Meirelles e Nardi (2003) isolaram uma linhagem de CT mesenquimais murinas, caracterizando sua morfologia, seus marcadores de superfície e sua cinética de crescimento *in vitro*. Eles demonstraram que estas células podem se diferenciar a uma rota osteogênica, outra adipogênica, ou ainda sofrer uma transdiferenciação para uma rota de desenvolvimento ectodérmico, permitindo diferenciação a células de tecido nervoso.

Gronthos e cols. (2001) pesquisaram adipócitos derivados da MO como fonte potencial para CT mesenquimais. Eles determinaram o fenótipo daquelas células, tanto em estado indiferenciado como diferenciado. As células adiposas da MO têm similaridades com as CT mesenquimais e podem ser integradas em técnicas de ET.

Yoshikawa e cols. (1999) utilizaram métodos de reconstrução óssea por ET. Eles fizeram o cultivo de osso *in vitro* em uma estrutura porosa de cerâmica de HA. Após duas semanas de cultura, a estrutura demonstrou a existência de fibras



mineralizadas de colágeno na superfície da HA, conforme avaliação por microscopia eletrônica de varredura. A estrutura também demonstrou FA e osteocalcina elevadas. A cultura foi implantada e houve aumento de tecido ósseo, avaliado por microscopia eletrônica. A atividade osteoblástica manteve-se por até um ano. O desempenho do enxerto foi avaliado também por análise por *Northern blot*, que ratificou a expressão aumentada de RNA mensageiro para FA e osteocalcina, em comparação a implantes-controle. Os resultados demonstraram a efetividade da reconstrução com osso cultivado.

O mesmo autor observou a regeneração óssea com cerâmica e osso autógeno cultivado (Yoshikawa, 2003). Um estudo em cães avaliou, após três semanas de implantação, que a formação óssea na superfície da cerâmica era espessa, e a FA foi detectada em níveis elevados. Após oito semanas, notou-se invasão vascular dos poros e a presença de MO. Nos poros da cerâmica, linhagens hematopoiética também foram encontradas.

Batouli e cols. (2003) compararam a osteogênese e a dentinogênese com o uso de CT. Eles avaliaram células humanas, sendo que as CT mononucleares da MO foram obtidas de coletas laboratoriais da Empresa Poietic Technologies (Gaithersburg, MD, USA), e as CT da polpa dentária (PD), a partir de terceiros molares extraídos na Dental Clinic of the National Institute of Dental and Craniofacial Research. As células foram cultivadas sobre um pó de cerâmica de HA e fosfato de cálcio, em uma concentração de aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml. A incubação foi a 37,0 °C por 2 horas. Este material foi transportado para o subcutâneo de camundongos imunocomprometidos. A avaliação foi feita após duas, quatro, oito e 16 semanas. Após quatro semanas, tanto as CT da MO quanto as da PD apresentaram diferenciação a osteoblastos e odontoblastos, respectivamente. Nesse período, já foram capazes de gerar, respectivamente, MO e dentina.

A CT da MO e a CT da PD são multipotentes e podem se diferenciar a várias linhagens celulares, quais sejam: osteoblastos, odontoblastos, adipócitos e células neurais. No entanto, os autores concluíram que os mecanismos de regeneração para estes dois tecidos, osso e polpa dentária, são diferentes.

Ozturk e cols. (2005) publicaram um estudo sobre reconstrução óssea com CT extraídas da MO e estimuladas com prostaglandina E2. Nos animais em que a prostaglandina foi utilizada – ratos Wistar –, houve aumento da cicatrização óssea.

Riley (1996) revisou a biologia e as aplicações possíveis para a BMP-2. As BMP pertencem a uma superfamília do fator de crescimento de transformação-beta. A BMP-2 tem funções pleiotrópicas que vão desde a organogênese, esquelética e extra-esquelética, até a geração e regeneração óssea. Vários autores têm utilizado a BMP-2 para tratamentos de não-união óssea e para fusão espinhal.

Chang e cols. (2003) estudaram um modelo animal para avaliar se CT transfectadas com um adenovírus carreador do gene para BMP-2 humana aumentariam a formação de osso autólogo para o reparo de defeitos cranianos. Eles criaram dois defeitos de 2 x 5 cm em crânios suínos, sendo um para controle, onde utilizou-se apenas CT. Tanto a dura-máter como o perióstio foram retirados das falhas. A concentração de células utilizadas foi de  $5 \times 10^7$ /ml. As análises foram realizadas após seis e 12 semanas. Houve diferença significativa na regeneração óssea entre o lado tratado com BMP-2 e o lado controle em 12 semanas ( $P < 0,001$ ). As áreas foram submetidas a um teste de resistência biomecânica, demonstrando similaridade com o osso craniano normal ( $P = 0,227$ ).

Kitoh e cols. (2004) associaram a distração osteogênica com o transplante de CT mesenquimais na mesma região tratada. Eles demonstram aceleração da regeneração nos casos relatados.

A FA é uma enzima que reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção da renovação óssea (Yoshikawa, 1999). Trata-se de uma glicoproteína associada à formação de tecidos calcificados. A FA catalisa a hidrólise dos ésteres de fosfato em pH alcalino e parece ser um pré-requisito para a mineralização normal do esqueleto (Stucki, 2001). Em humanos, essa enzima ocorre de maneira ubíqua, e três isoenzimas são identificadas: inespecífica, intestinal e placentária (Sabokbar, 1994). No entanto, o osso não é a única fonte de FA no organismo. Isso pode levar a vieses 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.

A FA parece ser um sinal precoce da secreção osteoblástica de uma matriz, que subseqüentemente transformar-se-á em osso. Stucki e cols. (2001) demonstraram que: (a) a osteogênese na regeneração tecidual guiada é precedida por um aumento localizado e significativo da FA; (b) a neogênese óssea é um evento precoce e pode ser detectada com apenas duas semanas após a cicatrização; (c) a expressão de FA e a neogênese óssea subseqüente são interligadas e originárias das estruturas ósseas pré-existentes.

Warnke e cols. (2004) apresentaram um relato de caso interessante sobre reconstrução parcial de mandíbula com a utilização de técnicas de ET. Um paciente de 58 anos havia sido submetido a uma mandibulectomia subtotal oito anos antes, devido a um tumor maligno. Uma reconstrução foi realizada com os seguintes elementos: tela de titânio pré-moldada; blocos de osso mineral; BMP-7; colágeno bovino tipo 1; aspirado de MO da crista íliaca para inserir precursores celulares indiferenciados – que seriam alvo da BMP; osso mineral bovino, misturado com o aspirado de MO.

Essa composição de enxertos foi colocada dentro do músculo grande dorsal por sete semanas, para compor um retalho pré-moldado, posteriormente transferido como retalho livre. Conforme demonstrado por cintilografia e TC, houve remodelação e mineralização após a cirurgia. O paciente teve melhoria funcional e estética.

Ferreira (1997) avaliou a reconstrução do arco zigomático de coelhos Nova Zelândia com três tipos de enxerto ósseo: autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados. Ele demonstrou que os transplantes do grupo homogêneo fresco apresentaram os maiores índices de atividade osteoclástica e os menores índices de atividade osteoblástica, com tendência ao balanço negativo na integração óssea. Já os transplantes do grupo homogêneo congelado apresentaram os menores índices de atividade osteoclástica tardiamente, acompanhados de índices relativamente altos de atividade osteoblástica, o que demonstrou a manutenção de sua propriedade de osteoindução, justificando seu uso clínico.

Kilian e cols. (2005) estudaram os efeitos dos fatores de crescimento plaquetários (PDGF) na neo-formação vascular e a expressão dos receptores de VEGF em defeitos ósseos preenchidos com uma pasta de HA em suínos. Foram criados defeitos cilíndricos de 8,9mm de diâmetro e 10mm de profundidade na região subcondral do côndilo do fêmur direito dos animais que foram preenchidos com a pasta de HA em um grupo e HA enriquecida com PDGF em outro grupo. Os animais foram sacrificados 20 dias depois e a expressão do VEGF foi maior no grupo com HA enriquecida de PDGF assim como o número de vasos neoformados em comparação com o grupo que continha apenas a HA.

Chouteau e cols. (2003) estudaram a interação de culturas de osteoblastos e fibroblastos com uma cerâmica macroporosa composta de 70% de HA e 30% de trifosfato de cálcio processada com diferentes tamanhos de macroporosidade e com

ou sem microporosidade na superfície. Através da microscopia por scanner de elétrons o comportamento celular em contato com a superfície dos substitutos ósseo foi analisada além da análise histológica da invasão celular dos materiais. Houve um crescimento exponencial de ambos grupamentos celulares, o tamanho de macroporos de 300  $\mu\text{m}$  ou mais pareceu suportar bem a colonização e a microporosidade não pareceu interferir a colonização celular. Os autores concluem que esses materiais estudados são moderadamente osteoindutores mas não possuem propriedades osteoindutivas. Uma associação híbrida de células osteogênicas e cerâmicas de fosfato de cálcio poderiam compor um material com propriedades osteoindutivas.

## 5. MÉTODO

### 5.1 Delineamento

Estudo experimental, aberto, comparado e prospectivo.

### 5.2 Locais de Realização

A pesquisa foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participaram do projeto a Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial – Cirurgia Plástica – HCPA, o Banco de Ossos – Serviço de Ortopedia e Traumatologia – HCPA, o Laboratório de Biomaterias – Faculdade de Engenharia da UFRGS, o Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS, a Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa (CP) – HCPA, o Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina – UFRGS e o Serviço de Patologia Clínica – CP – HCPA.

### 5.3 População

Foram utilizados 45 camundongos adultos, fêmeas, da linhagem isogênica C57BL/6, com dois meses de vida e peso entre 20g e 80g (conforme pode ser visualizado na Figura 2). A escolha por fêmeas ocorreu em função da possibilidade de, futuramente, rastrear as CT das culturas do Laboratório de Imunogenética que são feitas a partir de animais machos. Assim, poder-se-ia marcar o cromossomo Y para identificação das CT após a implantação nas áreas a serem reconstruídas. Esses camundongos foram colocados em caixas contendo cinco animais por caixa (caixas um a nove). As referências dos animais estão descritas no Anexo I.

### 5.4 Preparo dos Animais e Técnica Cirúrgica

Foram obedecidas todas as normas de bioética estabelecidas pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – HCPA, da Unidade de Experimentação Animal – CP – HCPA e do *National Institutes of Health (NIRC)*. Todos os procedimentos cirúrgicos, inclusive a retirada dos enxertos ósseos, foram realizados sob cuidados estritos de anti-sepsia.

Foi realizada tricotomia da região crânio cervical dos animais após a indução anestésica com quetamina (10mg/kg; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (5mg/kg; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), administradas via intra-peritoneal. Foi aplicada solução de iodoform aquoso em toda a cabeça do animal para

a anti-sepsia e a região operatória foi isolada com campos estéreis. Após o término do procedimento cirúrgico a analgesia foi, imediatamente, realizada com tramadol (1,5mg/kg Carlo Erba S. A., Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) administrado em dose única via subcutânea. No período pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas com ciclos de 12 horas de luz, com acesso à água e à comida *ad libitum*. A antibioticoprofilaxia utilizada foi uma solução de oxitetraciclina (Pfizer, São Paulo, Brasil) na concentração de 20mg/kg, diluída em água, ofertada aos animais nos primeiros 7 dias de pós-operatório.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com técnica microcirúrgica e auxílio de microscópio. Após a indução anestésica, a tricotomia e o posicionamento, foi realizada uma incisão em forma de meia-lua na região biparietal com levantamento de um retalho cutâneo expondo a região parietal direita do animal (Figura 3). Com um dissector delicado foi descolado o periósteo (Figura 4). Foram criadas falhas ósseas com uso de broca cirúrgica do tipo lâmina de craniótomo *Midas Rex Legend 8TA11 1714E* (Figura 5) de espessura total na região do osso parietal, a serem reconstruídas no mesmo tempo cirúrgico por diferentes maneiras, de acordo com cada grupo em estudo. Foi utilizado um motor do tipo *drill* que girava a lâmina a 10.000 rotações por minuto. A falha de forma retangular, medindo pelo menos 3mm x 5mm, foi cuidadosamente realizada no osso parietal direito com a broca e irrigação contínua (Figura 6 e Figura 7). Em seguida, um descolador de periósteo delicado foi empregado para abrir a falha, minimizando lacerações meníngeas (Figura 8).

Por meio de um estudo-piloto, foi demonstrado que uma falha de 3mm x 5mm pode ser utilizada, sem que haja o viés da regeneração total espontânea da falha – como demonstrado em estudo anterior da mesma linha de pesquisa (Portinho, 2006). A falha óssea do estudo não envolveu as suturas cranianas, que têm sabidamente um comportamento biomolecular diferente das outras regiões do osso craniofacial (Alberius, 1990).

Os animais foram sacrificados após quatro semanas de pós-operatório em câmara de CO<sub>2</sub> (Biotécnicas, São Paulo, SP) (Figura 9), conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa – HCPA. O período de quatro semanas foi escolhido porque já foi demonstrado que a osteogênese de enxertos inicia-se entre duas e quatro semanas de pós-operatório (Batouli, 2003).

## **5.5 Determinação do Modelo Experimental e da Falha Crítica**

Foram utilizados os dados da linha de pesquisa para a determinação da falha crítica. Conforme discutido na literatura (Oliveira, 2002), foram criadas falhas retangulares de espessura total de um osso parietal.

Estes animais foram escolhidos por que:

1. as células isoladas e cultivadas no Departamento de Genética da UFRGS são desses animais;
2. a utilização de animais isogênicos facilita sobremaneira a extração celular e o enxerto de tecidos, não necessitando que esses procedimentos sejam feitos para cada animal;
3. não há preocupação com barreiras imunológicas;
4. há trabalhos na literatura que utilizam camundongos para enxertos ósseos (Batouli, 2003).

## **5.6 Matriz Óssea**

O OL tem sido utilizado em larga escala em procedimentos cirúrgicos de Ortopedia. Além disso, Oliveira e cols. (2002), em trabalho já apresentado neste Curso de Pós-Graduação, confirmaram características favoráveis a seu uso, principalmente quanto à sua osteocondutibilidade. O OL não costuma ser osteoindutivo, ainda mais quando colocado heterotopicamente e em outra espécie (xenoenxerto), embora alguns autores tenham descrito tal propriedade com doadores jovens (Lohmann, 2001).

O protocolo de liofilização do Banco de Ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA está descrito no Anexo II.

Como existe variação das propriedades do OL que são dependentes da idade do doador, da porosidade e da estocagem (Schwartz, 1996), foi utilizado um bloco de fêmur bovino de um mesmo doador para todos os grupos em estudo.

Os blocos de OL foram confeccionados no formato retangular, com a espessura o mais delgada possível no intuito de se aproximarem ao máximo do tamanho da falha óssea que preencheriam (Figura 10). Esses blocos foram esterilizados em autoclave e encaminhados para a cultura celular

A HA utilizada no trabalho foi precipitada no laboratório de biomateriais da UFRGS pelo método da Via-Úmida com o uso de defloculantes. Após a precipitação, o material foi calcinado a 1300°C no intuito de diminuir a área superficial específica

do pó, permitindo uma maior incorporação de sólidos em uma suspensão aquosa. Os blocos porosos foram obtidos pelo método *gelcasting* de espumas. A comprovação da pureza da matéria-prima utilizada se deu por difração de raios X e espectroscopia de infravermelho. A média de tamanho dos poros do material foi 195 µm e porosidade de 86% . A descrição do método de obtenção da HA está no Anexo III.

Os blocos de HA foram confeccionados no formato retangular, com a espessura o mais delgada possível no intuito de se aproximarem ao máximo do tamanho da falha óssea que preencheriam (Figura 10). Esses blocos foram esterilizados em autoclave e encaminhados para a cultura celular.

### **5.7 Grupos de Estudo**

Os grupos de estudo foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo 1:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de HA na falha óssea produzida em cultura de CT (HA + CT).
- **Grupo 2:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de HÁ na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (HA + CT + VEGF).
- **Grupo 3:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de OL na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (OL + CT + VEGF).

Como o trabalho está inserido em uma linha de pesquisa, os grupos OL + CT e o grupo controle (craniotomia e recolocação da falha óssea) já foram realizados em experimento anterior ao descrito.

### **5.8 Cultivo Celular de CT Mesenquimais Adultas de Camundongos Isogênicos C57BL/6**

As culturas de CT foram realizadas no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS.

As CT foram isoladas a partir de um aspirado de medula óssea (Figura 11). Os cultivos celulares utilizados foram de baixa densidade, para isolar as CT mesenquimais. O isolamento e a preparação das culturas celulares previamente à colocação na matriz óssea seguiu o protocolo de Meirelles e Nardi (2003). A concentração celular em cada amostra foi de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml.



A proliferação das colônias foi realizada sem adição de fatores de crescimento, conforme descrito por Zvaifler e cols. (2000). Para a separação das CT mesenquimais a partir do aspirado de medula óssea, foram utilizadas as propriedades biológicas das CT mesenquimais e as do meio de cultura empregado (aderência x sobrenadante).

O VEGF utilizado no experimento foi o VEGF humano 165 (Genetech USA) gentilmente cedido pelo Dr. Renato Kalil que tem uma linha de pesquisa com o VEGF em cardiologia e detém os direitos sobre o uso do mesmo. O método de transfecção foi realizado conforme o protocolo de Jacobsen (2003) e Jordan (2003).

### **5.9 Procedimento de Randomização dos Grupos de Estudo**

As cirurgias foram realizadas em 3 dias, na proporção de 15 animais por dia, com intervalo de duas semanas entre elas. No primeiro dia (D1) foram operados os animais das caixas 1, 2 e 3. No segundo dia (D2), os animais das caixas 4, 5 e 6 e no terceiro dia (D3) foram operados os animais das caixas 7, 8 e 9.

Os blocos de matriz óssea enriquecidos com as culturas celulares foram colocados em placas de 24 poços, com a identificação do conteúdo de cada poço (Figura 12). Em cada dia de cirurgia foram utilizados, de forma aleatória, os 3 tipos de métodos de reconstrução a serem investigados.

Os procedimentos de indução anestésica e a criação da falha óssea foram realizados sem o conhecimento prévio sobre qual método de reconstrução seria empregado. Após o término da craniotomia, ou seja, imediatamente antes de iniciar a reconstrução óssea, foi realizado um sorteio para a escolha do tipo de reconstrução empregada. Esse dado foi anotado e a reconstrução sorteada realizada. Após o término do procedimento cirúrgico e da aplicação da analgesia subcutânea com tramadol, um novo sorteio foi realizado para identificar o animal por meio da pintura de sua cauda. Como haviam 5 animais por caixa, foram utilizados 5 tipos de identificação baseados em 4 cores: PRETO, VERMELHO, AZUL, VERDE e SEM COR. Portanto, em cada caixa (caixas 1 a 9) de 5 animais foi colocado um animal de cada cor (Figura 13) e cada animal teve, por sorteio, sua alocação nos grupos de pesquisa.

Os dados referentes ao animal operado, à caixa pertencente, ao tipo de reconstrução realizada, à cor da cauda e ao tempo de cirurgia foram preenchidos na forma de um protocolo descrito no Anexo IV.

## **5.10 Análise das Amostras**

Foram feitas avaliações histológicas e bioquímicas de cada grupo de estudo e seus resultados foram posteriormente comparados. Tais avaliações foram feitas a partir de amostras do enxerto retiradas na quarta semana de pós-operatório.

Os animais foram sacrificados (conforme protocolo do Centro de Pesquisas do HCPA) após quatro semanas de pós-operatório. Estudos prévios demonstraram cicatrização óssea significativa a partir de duas a quatro semanas após a colocação do enxerto (Brodie, 2005; Batouli, 2004; Lohmann, 2001; Schwartz, 1996). O bloco de osso enxertado na falha óssea foi retirado (por osteotomias), sem margem de osso além do enxerto para evitar obliquidade na aferição da FA (Figura 14). Metade do fragmento ósseo retirado foi colocado em formalina e levado à preparação histológica com hematoxilina-eosina (HE). A outra metade foi colocada em soro fisiológico e transportada imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica – CP – HCPA, para análise da FA (Figura 15).

### **5.10.1 Análise Histológica**

As lâminas histológicas foram descalcificadas com óxido nítrico a 10% e coradas com HE para avaliação por microscopia óptica. A análise foi executada no Serviço de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, por um patologista “cegado”.

A análise histológica das lâminas contendo OL como matriz inorgânica foi realizada considerando a escala de Ferreira (1997), que utiliza os seguintes critérios:

1. trabéculas ósseas neoformadas (0 a 3);
2. atividade osteoblástica (0 a 3);
3. atividade osteoclástica (número absoluto em campo de 400 vezes);
4. absorção do transplante (0 a 3);
5. viabilidade da medula óssea (0 ou 1).

A escala incluía, originalmente, o critério de fusão de corticais. Tal critério foi excluído por não poder ser aferido, uma vez que o bloco de OL foi retirado sem margens do osso nativo, a fim de não prejudicar as aferições bioquímicas.

O critério de atividade osteoclástica foi estratificado e analisado em separado, já que se tratava de um número absoluto, tendo muito mais peso do que os outros critérios para o somatório final. Essa escala permitiu uma análise histológica quantitativa.

A classificação para cada critério histológico está demonstrada na Tabela 2 (Anexo V).

A análise histológica das lâminas contendo HA como matriz inorgânica, por não preencherem critérios de neoformação óssea que pudessem ser aplicados na escala de Ferreira (1997), foi realizada pela técnica de coloração de picrossirius, que indica a presença de colágeno.

### **5.10.2 Análise Bioquímica**

A atividade de FA foi expressa em unidade por minuto por miligrama de osso do enxerto. A enzima foi extraída das amostras com o auxílio de Triton 0,2% e sua atividade ensaiada de acordo com a padronização de Yoshikawa e cols. (1999), utilizando como substrato o p-nitrofenilfosfato (kit de diagnóstico Sera–Pak Bayer®, São Paulo, Brasil).

Através da análise de curvas de tempo e concentração, foi utilizado o mesmo tempo de incubação preconizado pelo fabricante de 30 minutos. Esta técnica já foi previamente utilizada na linha de pesquisa.

Os valores de atividade de FA foram obtidos por meio da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{FATOR X } \Delta\text{ABS} / \text{MASSA AMOSTRA} = \text{U/min/mg de osso}$$

### **5.11 Aspectos Bioéticos**

O trabalho foi feito visando minimizar o sofrimento dos animais envolvidos. Em todos os procedimentos cirúrgicos, foi utilizada anestesia com quetamina e xilazina. A eutanásia, ao fim do experimento, foi feita com câmara de CO<sub>2</sub> T61 (Biotécnicas, São Paulo, SP). Os animais foram sacrificados pela necessidade do estudo da área óssea receptora. Não houve necessidade de sacrifício após a aspiração da medula óssea.

### **5.12 Análise Estatística**

A análise estatística da FA foi feita utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas.

Uma diferença estatística foi considerada significativa sempre que o P foi menor que 0,05. A análise estatística foi realizada com o auxílio do grupo de

estatística do GPPG do HCPA de *softwares* específicos, como o SPSS® versão 11 do GPPG - HCPA.

A FA (variável não-paramétrica) foi apresentada também por meio da mediana e dos percentis 25 (P25) e 75 (P75) de cada grupo do estudo.

## 6. RESULTADOS

Dos 45 animais operados, os dois primeiros foram a óbito logo após a indução anestésica. Os procedimentos anestésicos foram iniciados utilizando-se medicações previamente diluídas que estavam devidamente armazenadas e dentro do seu período de validade. Após o óbito dos dois primeiros animais e da troca das medicações anestésicas não ocorreram mais óbitos.

Dois animais tiveram extrusão espontânea dos blocos colocados - com aparecimento na pele – que pode ser atribuída possivelmente a algum defeito no fechamento do retalho cutâneo (Figura 16). Em um animal não foi encontrado seu bloco de reconstrução no momento do sacrifício. Provavelmente isso se deve a uma extrusão cutânea do bloco e saída do sítio receptor. Estes animais foram excluídos do experimento.

### 6.1 Análise Bioquímica

Os valores de FA encontrados estão descritos na Tabela 3 (Anexo V). As análises realizadas apontam para um aumento significativo na expressão de FA, respectivamente nos grupos contendo OL em cultura de CT enriquecidas com VEGF (OL + CT + VEGF), HA em cultura de CT (HA + CT) e HA em cultura de CT enriquecidas com VEGF (HA + CT + VEGF) ( $P < 0,0001$ ).

O valor das medianas das dosagens de FA está expresso no Gráfico 2 (Anexo V) que mostra a presença significativa da FA no grupo da HA + CT e maior ainda no grupo HA + CT + VEGF em relação ao grupo OL + CT + VEGF.

Os valores das medianas das dosagens de FA e os percentis 25 e 75 (P25 e P75) dos grupos de estudo estão dispostos na Tabela 4.

### 6.2 Análise Histológica

A proposta inicial do trabalho foi de realizar a análise histológica utilizando-se a escala histológica de Ferreira (1997) – excluindo o critério “fusão de corticais” – seguindo os trabalhos da mesma linha de pesquisa que a utilizaram (Tabela 2, Anexo V).

No momento da análise, o patologista “cegado” percebeu que em algumas lâminas não havia uma formação óssea que permitisse a aplicação da escala proposta (Figura 17 e Figura 18). Nas lâminas em que a matriz óssea era o OL, os

critérios podiam ser preenchidos (Figura 19 e Figura 20), mas nas lâminas em que a matriz era a HA esses critérios não se aplicavam. Estas amostras foram então, novamente coradas pelo método de picrosirius (Figura 21 e Figura 22).

A análise histológica destas lâminas demonstrou a presença de colágeno, de um tecido granular com vasos proeminentes e de deposição de material fibrilar. Foi observado também um espessamento que aparentemente é o início de matriz óssea.

## 7. DISCUSSÃO

No experimento, optou-se pelo uso de camundongos C57BL/6 para desenvolver e aprimorar o modelo animal criado pela linha de pesquisa em que o trabalho está inserido. Pesquisas anteriores já haviam determinado que a falha de 3mm X 5mm realizada no osso parietal é a falha crítica para esse camundongo. Reconstruções “padrão ouro”, ou seja, de recolocação do próprio osso do animal também já foram estudadas. Esta é a menor falha crítica de um modelo animal experimental já descrita.

Por meio da confecção pré-operatória dos blocos de OL e HA do tamanho o mais próximo possível da falha óssea criada, foi simulada uma “prototipagem” com a intenção de uma reconstrução ideal, onde a falha óssea é preenchida na sua totalidade. Este fator é fundamental na integração de uma reconstrução de falha óssea craniana (Youmans, 2003).

Como foram utilizados dois tipos de matriz óssea inorgânica (OL e HA) e também culturas de CT com e sem VEGF, foi desenvolvido um método de randomização da técnica de reconstrução e identificação do animal para que o procedimento operatório realizado fosse “cegado”. Assim, o cirurgião não teve o benefício de aprimorar a técnica cirúrgica ao longo do experimento para utilizá-la em um determinado grupo a ser estudado.

Foram utilizados animais adultos porque a regeneração é menor e porque há maior absorção óssea em imaturos (Delacure, 1994; Riley, 1996). A opção por fêmeas é justificada pela possibilidade futura de marcar o cromossomo Y, já que todas as culturas celulares do Laboratório de Imunogenética foram realizadas com células de machos.

Foi escolhida a FA como método de avaliação da neoformação óssea porque diferentes estudos descritos pela literatura comprovam sua eficácia (Sabokbar, 1994; Yoshikawa, 1999 e 2003; Stucki, 2001; Ge, 2004). Além disso, nesta linha de pesquisa, foram demonstrados resultados significativos, utilizando a mesma técnica em experimentos anteriores.

A FA é uma enzima que pode se originar de vários tecidos do organismo. No entanto, foi utilizado um método desenvolvido na linha de pesquisa onde a aferição de sua concentração é feita apenas no enxerto realizado, de forma que outras fontes não influíssem nos valores calculados.

Devido ao tamanho do fragmento retirado não foi desenvolvida ainda a possibilidade de realizar outras dosagens bioquímicas no fragmento, como a osteopontina e osteocalcina, enzimas que também expressam atividade óssea e ajudariam muito na análise dos resultados.

A maior expressão de FA nos dois grupos contendo a HA sugere uma atividade metabólica mais intensa em relação ao grupo do OL + CT + VEGF, apesar de na análise histológica não ter sido encontrado claramente osso neoformado. O material colagenóide ou de matriz óssea muito jovem encontrado nas lâminas de HA sugere que, juntamente com uma significativa expressão de FA, a reconstrução com a HA parece ser mais apropriada para a calota craniana do modelo estudado.

Experimentos de reconstrução da falha com OL em cultura de CT mostraram, pelos critérios bioquímicos da expressão da FA, e pela aplicação da escala histológica proposta, resultados favoráveis já na quarta semana de pós-operatório. Analisando esses dados e os estudos de Brodie e cols. (2005), Batouli e cols. (2004), Lohmann e cols. (2001) e Schwartz e cols. (1996) que demonstraram osteogênese percebida a partir de duas semanas de pós-operatório, foi decidido analisar todos os grupos com quatro semanas de pós-operatório.

Uma análise histológica de reconstruções com HA realizadas nos mesmos moldes do trabalho apresentado, realizadas com oito semanas de pós-operatório, possivelmente responderão se todo o material colagenóide encontrado nas lâminas de quatro semanas pode ser osso neoformado.

A atuação das CT na área de regeneração ainda precisa ser melhor estabelecida. Não está esclarecido se estas células são responsáveis por todo o processo de regeneração ou se, em algum momento, tornam-se apenas coadjuvantes. A utilização de genes repórteres poderá permitir tal esclarecimento.

O grupo que continha o VEGF transfectado nas CT também mostrou uma expressão maior de FA em relação ao grupo sem VEGF com a mesma matriz (HA). O VEGF é um fator angiogênico e, portanto, parece também auxiliar no metabolismo de formação óssea. O papel do VEGF na formação óssea ainda não foi estabelecido. Estudos posteriores envolvendo angiogênese óssea poderão responder a essa questão.

O modelo de pesquisa utilizado não permite avaliar a resistência biomecânica do osso e esta investigação é fundamental para avaliar um tecido que serve principalmente para proteção na região craniana. Serão necessários experimentos



com modelos animais de maior porte, que possibilitem estudos apropriados para análise da resistência biomecânica do osso regenerado.

A interação entre células e matrizes tem sido estudada e foi evidenciado que proteínas de adesão são necessárias para que a célula se estabeleça sobre uma matriz. Hanks e Atkinson (2004) demonstraram que matrizes com expressão de moléculas de adesão apresentam maior capacidade de reter CT *in vitro* do que o OL simplesmente. Brodie e cols. (2005) comprovaram que a cobertura de matrizes de HA com colágeno tipo I aumentou a proliferação celular, provavelmente pela facilidade de adesão que foi criada. A falta de adesão pode levar à apoptose.

As CT mesenquimais parecem ter um elevado potencial biológico. As técnicas de ET que utilizem CT e matrizes ósseas combinadas, preparadas antes de sua implantação na área a ser reconstruída, podem ser promissoras para cirurgias reparadoras do esqueleto craniofacial em seres humanos.

Estudos subseqüentes serão necessários para aperfeiçoar a integração, regeneração e diferenciação do tecido ósseo no esqueleto craniofacial com protocolos de ET.

## **8. CONCLUSÃO**

A atividade da enzima FA verificada comprova que as reconstruções ósseas de HA acrescidas de CT e VEGF apresentam um elevado metabolismo de neoformação óssea.

A comparação entre os diferentes materiais de substituição óssea estudados indica que a HA enriquecida com CT e VEGF tem um potencial biológico superior ao OL (mesmo enriquecido com CT e VEGF) e à HA enriquecida apenas com CT.

A partir dos resultados obtidos é possível indicar que a capacidade de integração e regeneração de enxertos ósseos contendo CT mesenquimais e VEGF é favorável do ponto de vista bioquímico e histológico.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberius P, Isaksson S, Klinge B, Sjögren S, Jonsson J. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. Implications for positioning of osteotomies. *J Craniomaxillofac Surg* 1990;18(6):271-9.
2. Albrektsson T. Repair of bone grafts: a vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980;14:1-12.
3. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Ghebron-Robey P, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82(12):976-81.
4. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res* 2005;73(4):409-21.
5. Chang SC, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, Chen PK. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2003;112(7):1841-50.
6. Cheng MH, Brey EM, Allori A, Satterfield WC, Chang DW, Patrick CW Jr., Miller MJ. Ovine model for engineering bone segments. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):214-25.
10. Chouteau J, Bignon A, Chavassieux P, Chevalier J, Melin M, Fantozzi G, Boivin G, Hartmann D, Carret J-P. Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on macroporous calcium-phosphate bone substitutes. *Rev Chirurgie Orthopédique* 2003;89:44-52.
7. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydratation on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 1993;290:279-84.
8. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 2005;124(2):201-8.
9. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27:859-74.
10. Deluca L, Raszewski R, Tresser N, Guyuron B. The fate of preserved autogenous bone graft. *Plast Reconstr Surg* 1997;99(5):1325-8.
11. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Teteishi T. Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng* 2002;12(2): 203-9.

12. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, Laurencin CT. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24:1213-21.
13. 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. Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 1997.
14. Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg* 1992;3(1):25-9.
15. Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 2004;25(6):1049-58.
16. Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. *Int J Mol Med* 2005;15(6):899-905.
17. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimb JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189(1):54-63.
18. Gusmão SS, Souza JG. História da Neurocirurgia no Brasil. Ed Letra Médica, 2000. Pp. 27-33.
19. Hanks T Atkinson BL. Comparison of cell viability, on anorganic bone matrix or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials* 2004; 25(19):4831-6.
20. Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27(5):911-25.
21. Isaksson S, Alberius P, Klinge B, Jonsson J, Hallberg E, Wendel M. Regenerative response to membranous and endochondral lyophilized allogenic bone in rabbit skull defects. *Scand Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1992;26(2):147-53.
22. Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop*. 2003;32(9):429-36.
23. Jacobsen LB, Calvin SA, Colvin KE, Wright M. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 2004;33:104-12.
24. Jordan M, Wurm F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 2004;33:136-43.

25. Jinno T, Miric A, Feighan J, Kirk SK, Davy DT, Stevenson S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop Rel Res* 2000;375:275-85.
26. Jones NC, Trainor PA. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(5):645-57.
27. Kalil R A K, Sant'Anna R T. Terapia gênica aplicada às doenças cardiovasculares. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 2004;13(3):1-7.
28. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Mitsuyasu K, Ishiguro N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis – a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35:892-898.
29. Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE. Bony healing of large cranial and mandibular defects protect from soft-tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg* 1998;101(3):660-71.
30. Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes, DL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121(10):583-90.
31. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci* 2004;30(2):169-74.
32. Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop* 1999;34(9-10):529-34.
33. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123(4):702-11.
34. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med* 2001;226(6):507-20.
35. Miranda ES, Cardoso FTS, Medeiros JFF, Barreto MDAR, Teixeira RMM, Wanderley AL, Fernandes KE. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. *Acta ortop bras* 2005;13(5):245-48.

36. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *J Clin Orthop* 2002;395:66-80.
37. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthopaedics and Rel Res* 1990;259:223-32.
38. Nardi NB. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. *Medical hypotheses* 2005;64:811–17.
39. Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Porto Alegre, 2002.
40. Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone graft in the cranial skeleton: microarchitecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(2):291-9.
41. Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(1):139-47.
42. Ozturk AM, Cila E, Kanatli U, Isik I, Senkoylu A, Uzunok D, Piskin E. Treatment of segmental bone defects in rats by the stimulation of bone marrow osteoprogenitor cells with prostaglandin E2. *Int Orthop* 2005;29(2):73-7.
43. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:498-502.
44. Pereira RF, O'Hara M, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey S, Prockop DJ. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1142-7.
45. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999;360:71-86.
46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
47. Portinho CP. Reconstrução óssea de calota craniana com células-tronco mesenquimais – estudo experimental. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Porto Alegre, 2006.

48. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM Lieberman JR. Bone morphogenetic protein – 2: biology and applications. *Clin Orthop Rel Res* 1996;324:39-45.
49. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner* 1994;25:57-67.
50. Sailer HF, Pajarola GF. *Cirurgia Bucal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000. Pp. 213-20.
51. Schmidek, HH. *Schmidek & Sweet Operative Neurosurgical Techniques: Indications, Methods, and Results*. Ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000. Pp. 19-44.
52. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, De La Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996;67:918-26.
53. 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. *J Craniofac Surg* 2001;12(6):586-93.
54. Silva ABD, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Reis LM e cols. Retalho ósseo pré-fabricado com osso homogêneo: estudo da maturação óssea em um modelo experimental. *Acta Cir Bras* 2000; 15(S3):65-8.
55. Silva FH. Produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1 em linhagem de célula tronco mesenquimal murina. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS PPGGBM/UFGRS. Porto Alegre, 2006.
56. Sonoyama W, Coppe C, Gronthos S, Shi S. Skeletal stem cells in regenerative medicine. *Curr Top Dev Biol* 2005;67:305-23.
57. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 1996;324:66-74.
58. 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* 2001;12(2):121-7.
59. Sylvester KG, Longaker MT. Stem Cells: Review and Update. *Arch Surg* 2004;139:93-99.

60. Teixeira LA, Fricke CH, Bonorino CB, Bogo MR, Nardi NB. An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol.* 2001; 88(2): 159-65.
61. Ueda M, Yamada Y, Ozawa R, Okazaki Y. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25(2):129-37.
62. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. *Rev Bras Ortop* 2000;35(6):219-24.
63. Warnke PH, Springer ING, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PAJ, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularized bone graft in a man. *Lancet* 2004; 364: 766-70.
64. Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft--bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol* 1999; 88(3): 186-92.
65. Yoshikawa T, Iida J, Ueda Y, Kozumi M, Takakura Y, Nonomura A. Bone regeneration by grafting of an autogenous cultured bone/ceramic construct. *J Biomed Mater Res* 2003; 15; 67(4): 1427-41.
66. Youmans JR. *Neurological Surgery*. Ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 1996. Pp 1853-64.
67. Zasacki, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. *Clin Orthop Rel Res* 1991; 272: 82-7.
68. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2:477-88.



## 10. LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

### Lista de Figuras

Figura 1 – ROTAS DE DIFERENCIAÇÃO DA CT EM ADULTOS

Figura 2 – CAMUNDONGO C57BL/6

Figura 3 – EXPOSIÇÃO DA REGIÃO PARIETAL DIREITA

Figura 4 – DESCOLAMENTO DO PERIÓSTEO

Figura 5 – BROCA CIRÚRGICA UTILIZADA

Figura 6 – CONFECÇÃO DA FALHA ÓSSEA

Figura 7 – MENSURAÇÃO DA FALHA ÓSSEA

Figura 8 – ABERTURA DA FALHA ÓSSEA

Figura 9 – CÂMARA DE CO<sub>2</sub> DO CENTRO DE PESQUISAS DO HCPA

Figura 10 – BLOCOS DE OL E HA CONFECIONADOS PARA PREENCHER A FALHA ÓSSEA

Figura 11 – CULTIVO DE CT MESENQUIMAIS MURINAS. AMPLIAÇÃO: 100X

Figura 12 – PLACA DE 24 POÇOS DIVIDIDA EM 3 SESSÕES COM OS BLOCOS NAS CULTURAS UTILIZADAS

Figura 13 – ANIMAIS DE UMA CAIXA NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO COM AS CAUDAS PINTADAS PARA SUA IDENTIFICAÇÃO

Figura 14 – ASPECTO DA FALHA ÓSSEA NO MOMENTO DA RETIRADA DAS PEÇAS PARA ANÁLISE

Figura 15 – PEÇA RETIRADA E DIVIDA AO MEIO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Figura 16 – EXPOSIÇÃO CUTÂNEA DO BLOCO

Figura 17 – LÂMINA DE HA CORADA COM HE. AMPLIAÇÃO: 100X

Figura 18 – LÂMINA DE HA CORADA COM HE. AMPLIAÇÃO: 400X

Figura 19 – LÂMINA DE OL CORADA COM HE. AMPLIAÇÃO: 100X

Figura 20 – LÂMINA DE OL CORADA COM HE. AMPLIAÇÃO: 100X

Figura 21 – LÂMINAS DE HA CORADAS COM PICROSIRIUS. AMPLIAÇÃO: 100X

Figura 22 – LÂMINAS DE HA CORADAS COM PICROSIRIUS. AMPLIAÇÃO: 400X

Figura 23 – PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA HA UTILIZADA

Figura 24 – ESPECTROGRAMA DE INFRAVERMELHO DA HÁ

Figura 25 – MICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA HA

Tabela 2 – DETALHAMENTO DA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA, SEGUNDO FERREIRA (1997)

Tabela 3 – RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE FA

Tabela 4 – MEDIANAS, PERCENTIL 25 (P25) E PERCENTIL 75 (P75) DA EXPRESSÃO DE FA NOS GRUPOS DE ESTUDO

Tabela 5 – RESULTADOS OBTIDOS NA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA, SEGUNDO FERREIRA (1997)

### **Lista de Gráficos**

Gráfico 1 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS POROS

Gráfico 2 – MEDIANAS DA EXPRESSÃO DA FA NOS GRUPOS DE ESTUDO

## 11. FIGURAS

Figura 1 – ROTAS DE DIFERENCIAÇÃO DA CT EM ADULTOS

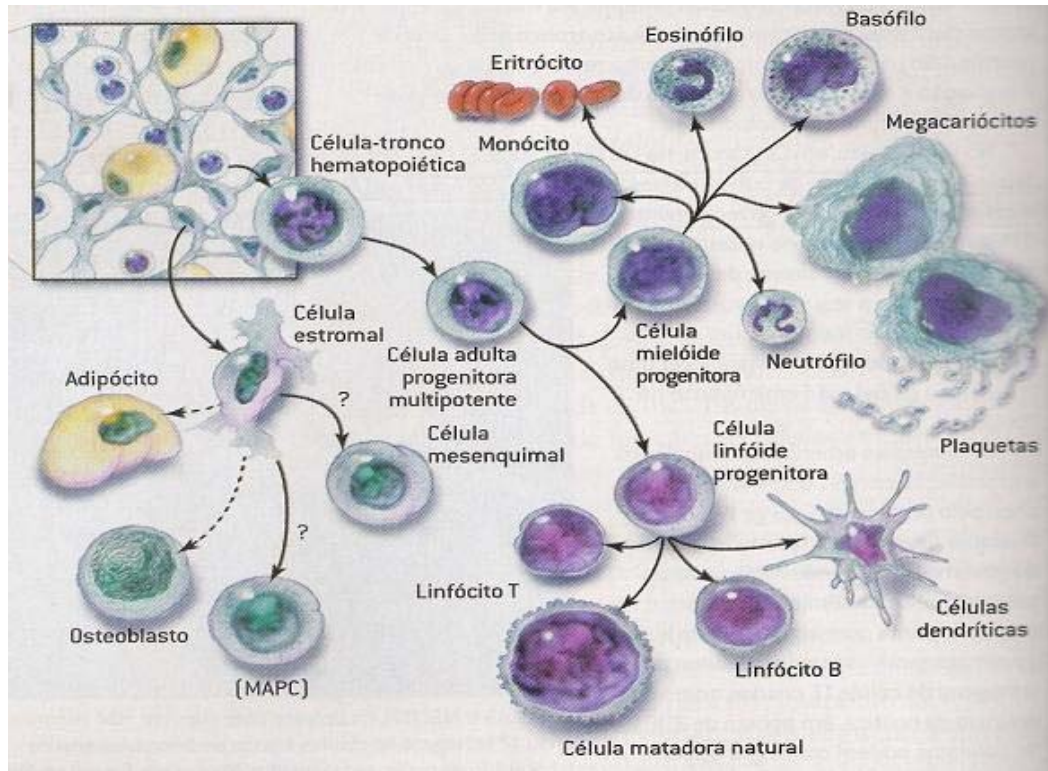
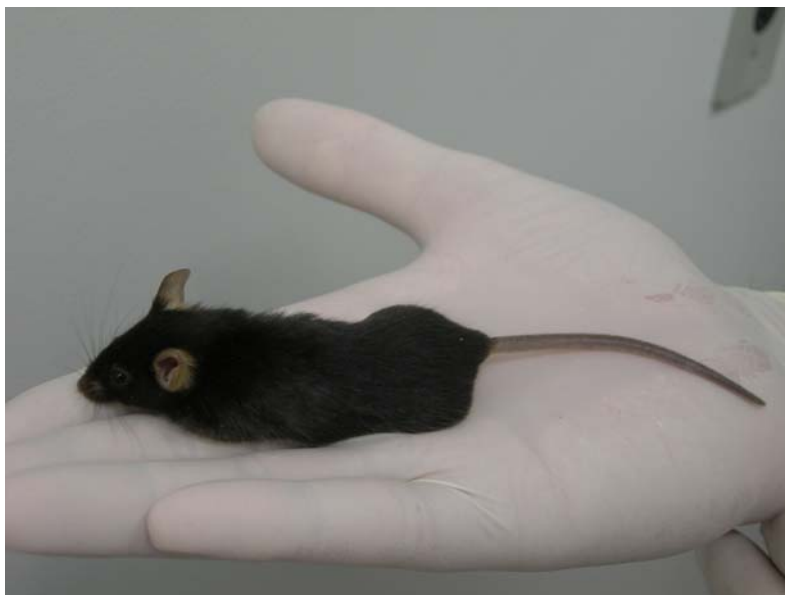


Figura 2 – CAMUNDONGO C57BL/6



**Figura 3 – EXPOSIÇÃO DA REGIÃO PARIETAL DIREITA**



**Figura 4 – DESCOLAMENTO DO PERIÓSTEO**

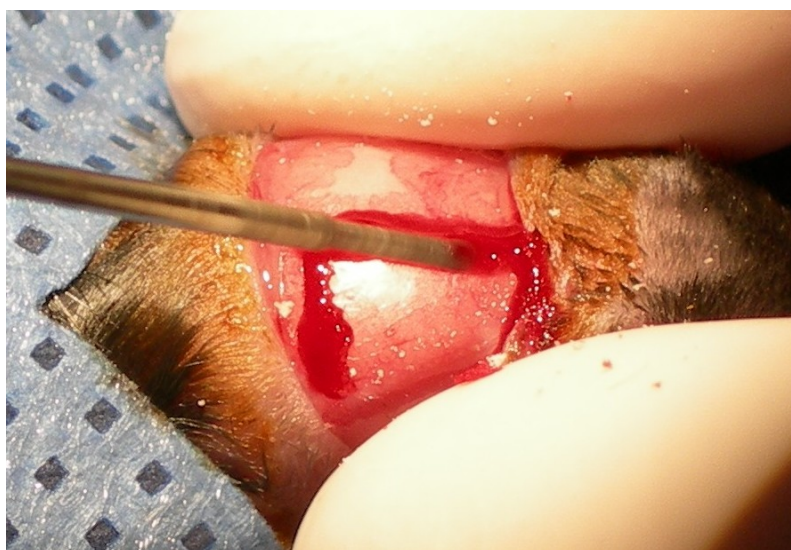




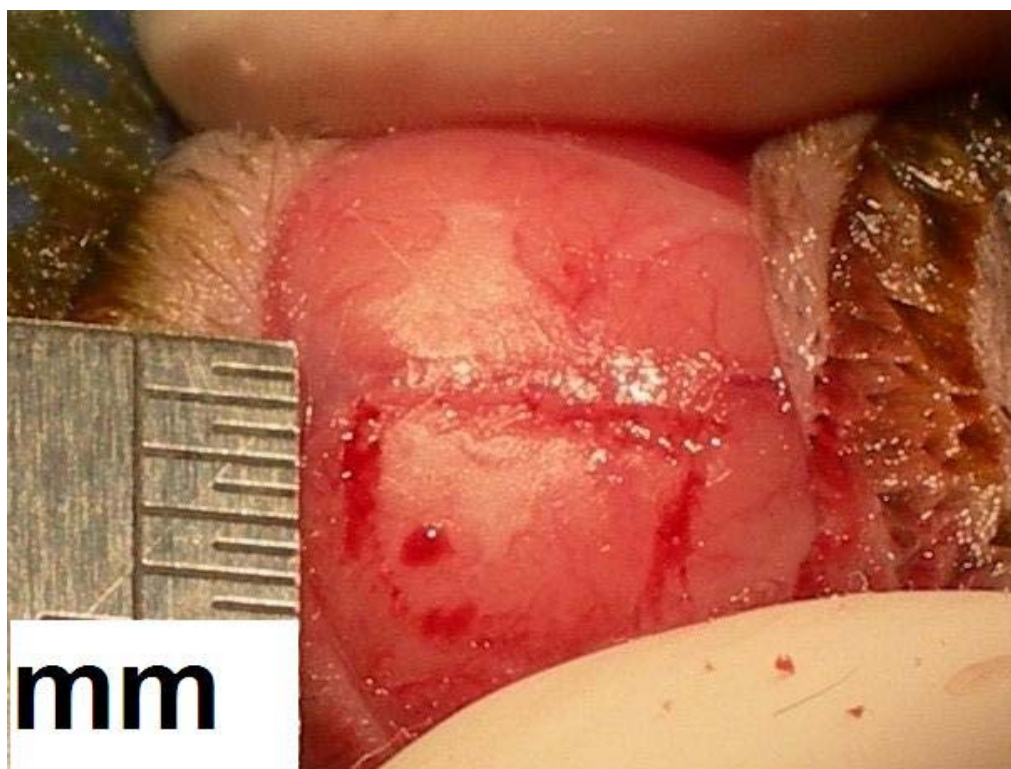
**Figura 5 – BROCA  
CIRÚRGICA UTILIZADA**



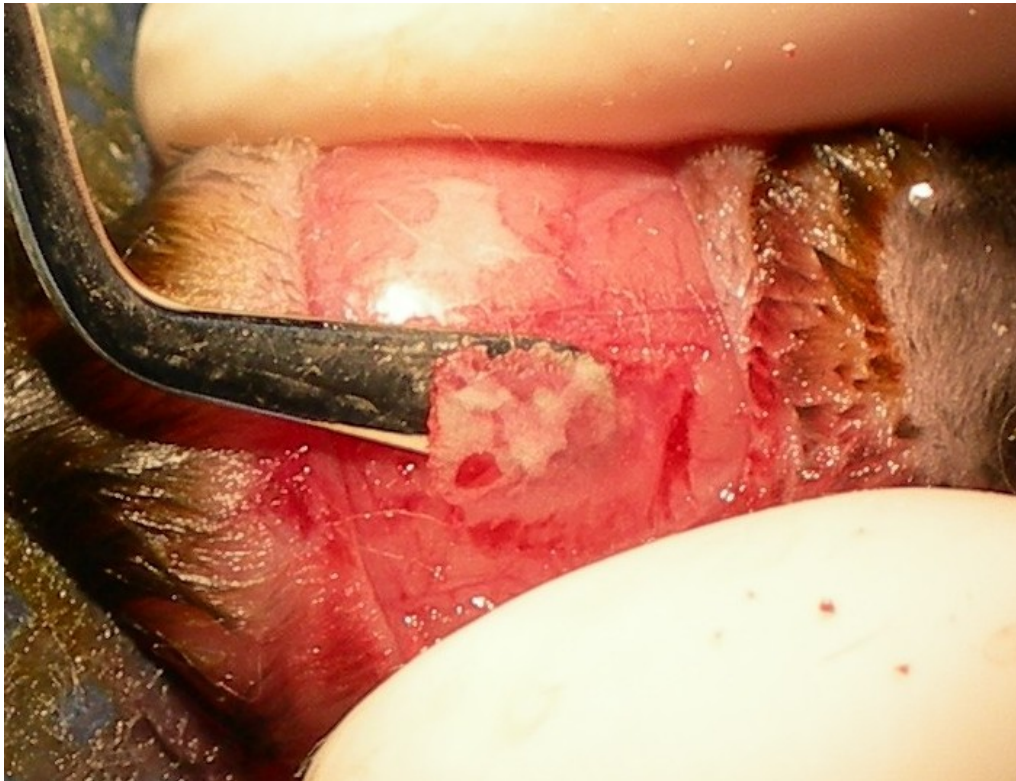
**Figura 6 – CONFECÇÃO DA FALHA ÓSSEA**



**Figura 7 – MENSURAÇÃO DA FALHA ÓSSEA**



**Figura 8 – ABERTURA DA FALHA ÓSSEA**



**Figura 9 – CÂMARA DE CO<sub>2</sub> DO CENTRO DE PESQUISAS DO HCPA**





Figura 10 – BLOCOS DE OL E HA CONFECCIONADOS PARA PREENCHER A FALHA ÓSSEA

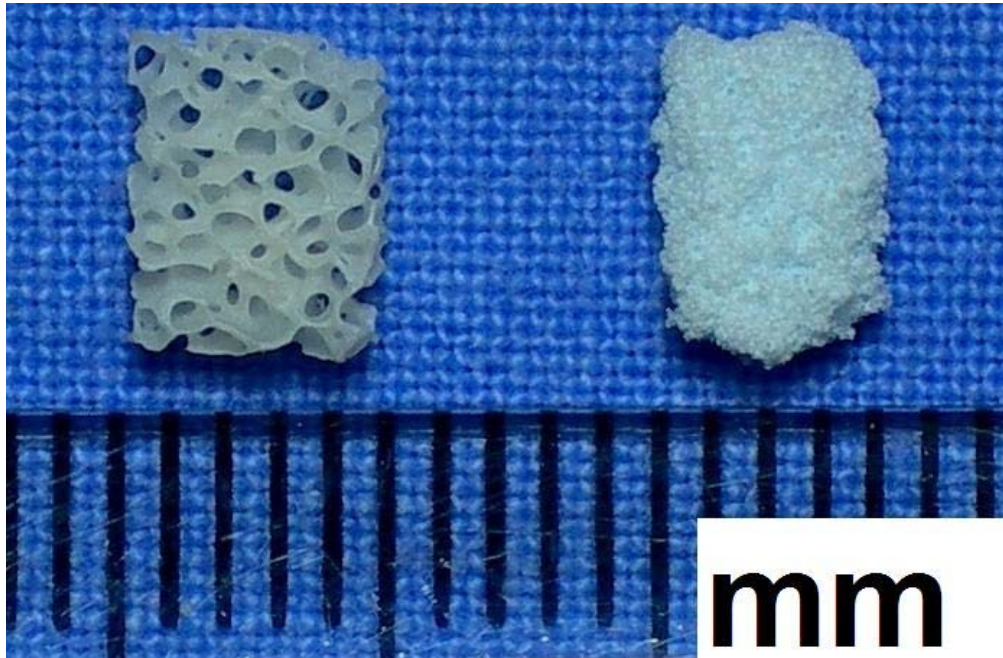
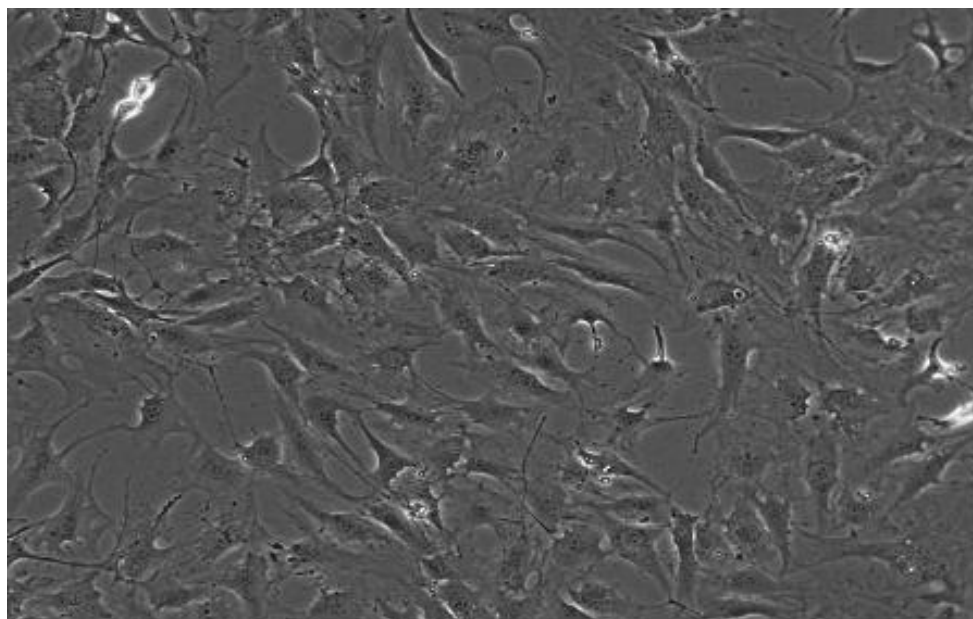
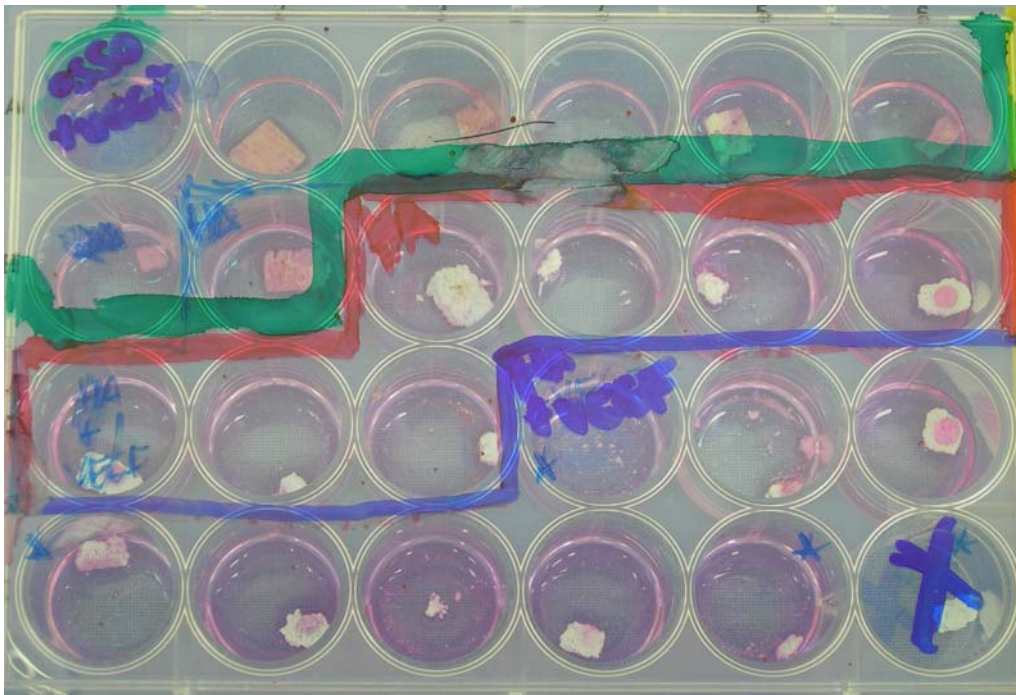


Figura 11 – CULTIVO DE CT MESENQUIMAIS MURINAS. AMPLIAÇÃO: 100X



**Figura 12 – PLACA DE 24 POÇOS DIVIDIDA EM 3 SESSÕES COM OS BLOCOS NAS CULTURAS UTILIZADAS**



**Figura 13 – ANIMAIS DE UMA CAIXA NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO COM AS CAUDAS PINTADAS PARA SUA IDENTIFICAÇÃO**

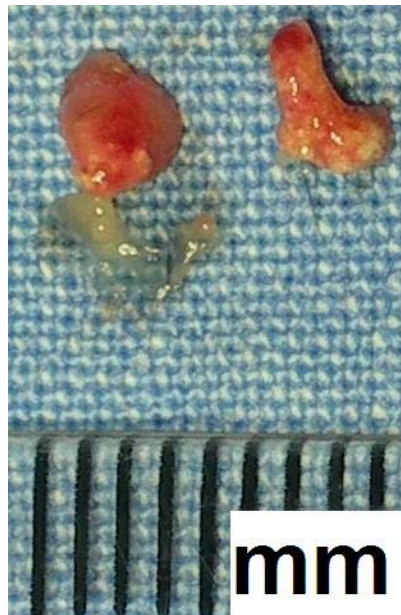




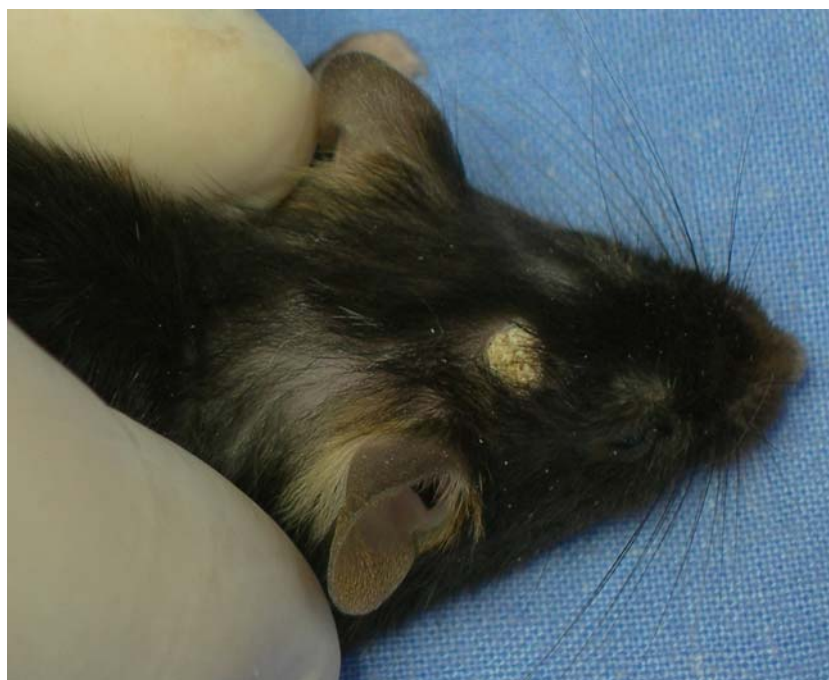
**Figura 14 – ASPECTO DA FALHA ÓSSEA NO MOMENTO DA RETIRADA DAS PEÇAS PARA ANÁLISE**



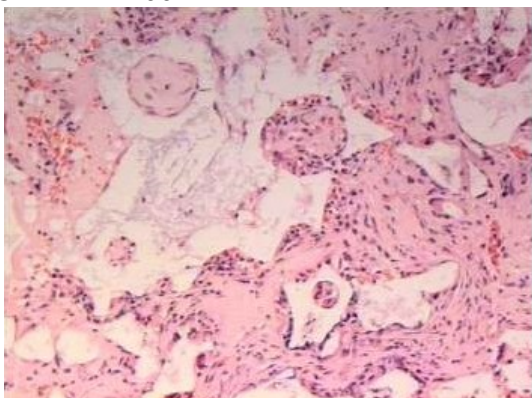
**Figura 15 – PEÇA RETIRADA E DIVIDIDA AO MEIO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA**



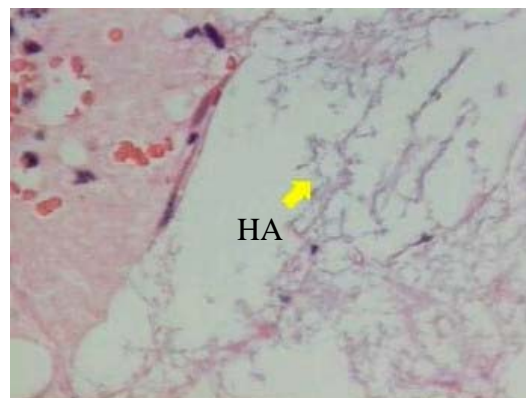
**Figura 16 – EXPOSIÇÃO CUTÂNEA DO BLOCO**



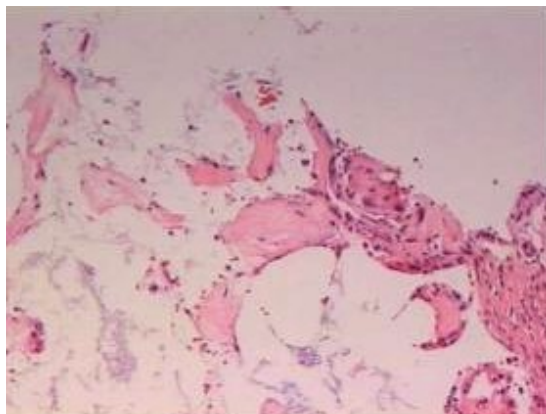
**Figura 17 – LÂMINA DE HA CORADA COM HE – 100X**



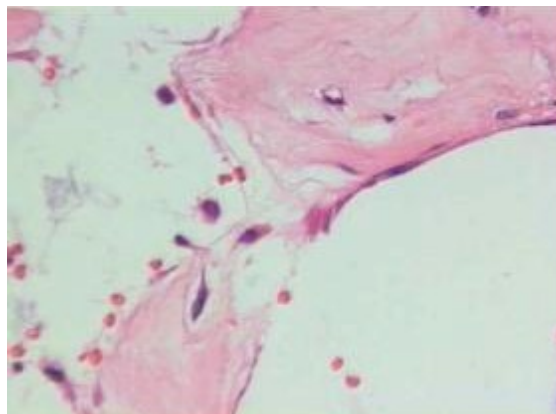
**Figura 18 – LÂMINA DE HA CORADA COM HE – 400X**



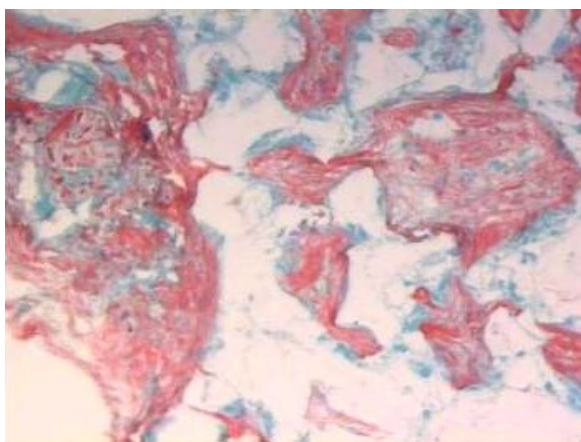
**Figura 19 – LÂMINA DE OL CORADA COM HE – 100X**



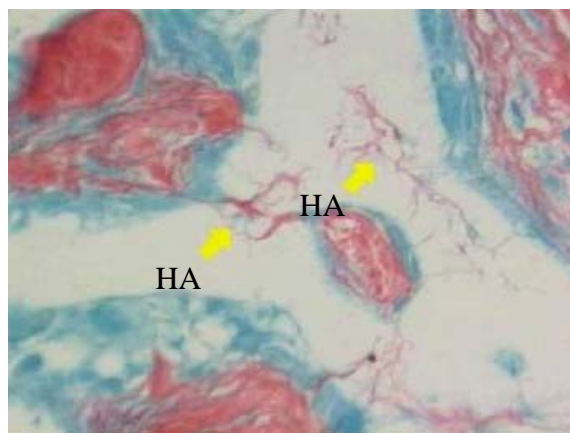
**Figura 20 – LÂMINA DE OL CORADA COM HE – 400X**



**Figura 21 – LÂMINAS DE HA CORADAS COM PICROSIRIUS – 100X**



**Figura 22 – LÂMINAS DE HA CORADAS COM PICROSIRIUS – 400X**



## 12. ANEXOS

### ANEXO I

#### Referências dos animais:

Pureza genética: Camundongos isogênicos C57BL/6N;

Pelagem: black

Padrão sanitário: convencional

Ectoparasita.....negativo

Endoparasita.....negativo

Vírus murinos.....negativo

Animais criados pelo método de acasalamento Brother & Sister de criação isogênico em condições sanitárias de biotério convencional.

Procedência: Coordenação de Produção e Experimentação Animal do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

## **ANEXO II**

### **Protocolo de liofilização do Banco de Ossos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA:**

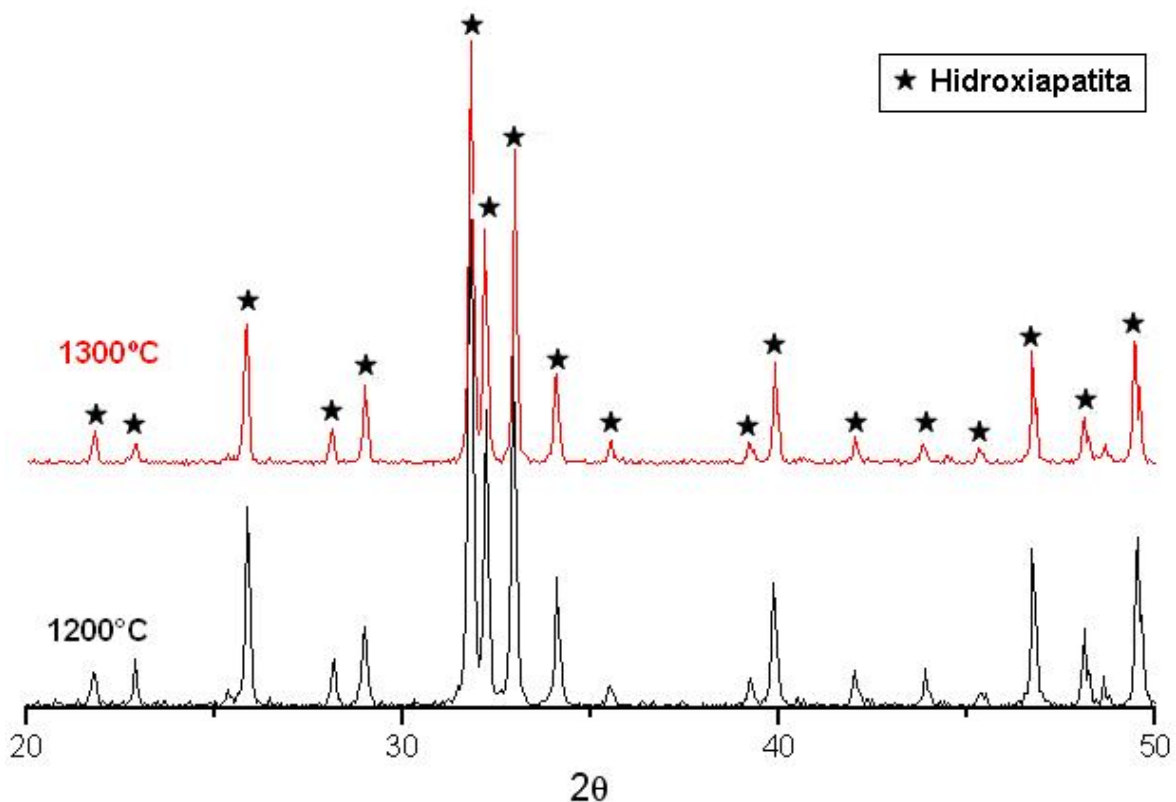
1. Imersão por uma hora em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %;
2. Lavagem em água filtrada a 4 °C;
3. Centrifugação a 2500 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos;
4. Desengorduramento em temperatura ambiente em uma solução de clorofórmio e metanol na diluição de 1:1. Durante este processo, a mistura de clorofórmio e metanol foi continuamente agitada e trocada nas primeiras horas, e depois a cada hora, de acordo com a sua coloração, permanecendo nesta mistura por 48 horas;
5. Centrifugação a 2500 RPM durante 10 minutos;
6. Aeração em contato direto com o meio ambiente por 24 horas, para evaporação do metanol e do clorofórmio;
7. Lavagem e agitação em água filtrada a 4°C por 24 horas;
8. Centrifugação a 2500 RPM por 10 minutos;
9. Liofilização a frio (-40°C) durante sete dias;
10. Empacotamento em embalagens permeáveis a gás;
11. Esterilização em autoclave por 10 minutos a 121°C.

### ANEXO III

#### Blocos porosos obtidos pelo método *gelcasting* de espumas

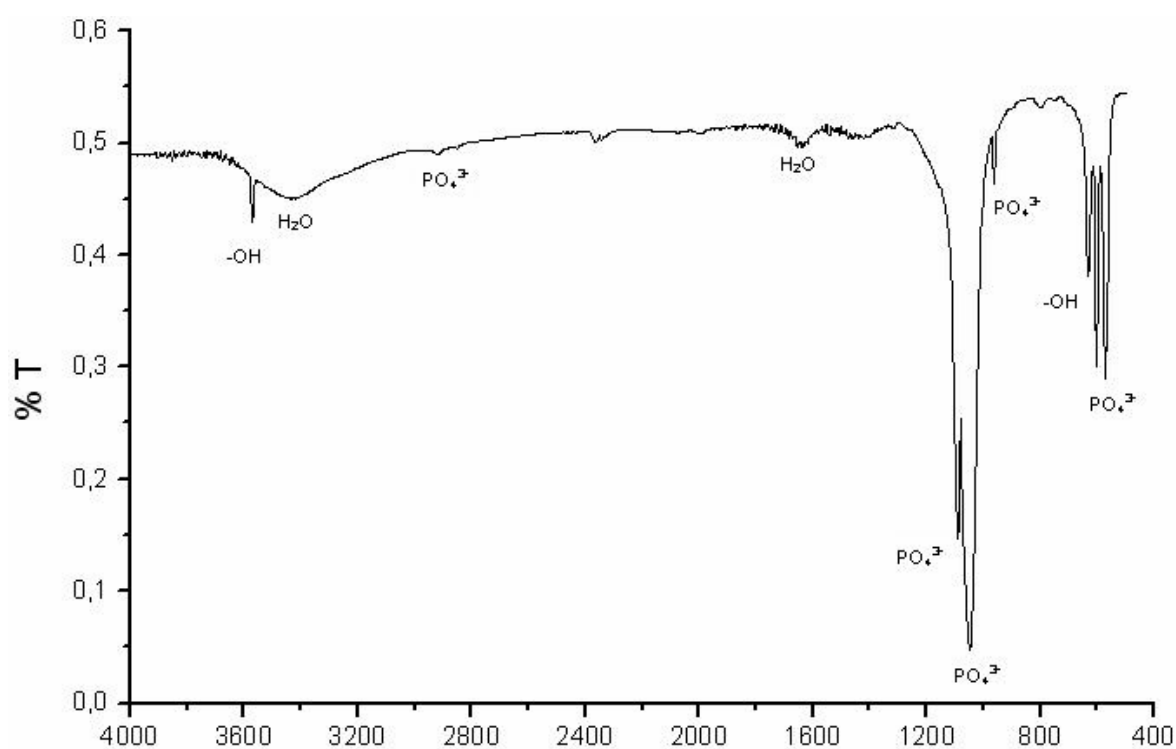
A hidroxiapatita utilizada no trabalho foi precipitada no laboratório de biomateriais da UFRGS pelo método da Via-Úmida com o uso de defloculantes. Após a precipitação, o material foi calcinado a 1300°C no intuito de diminuir a área superficial específica do pó, o que permite uma maior incorporação de sólidos em uma suspensão aquosa. Os blocos porosos foram obtidos pelo método *gelcasting* de espumas. A comprovação da pureza da matéria-prima utilizada se deu por difração de raios X e espectroscopia de infravermelho, Figuras 23 e 24, respectivamente:

Figura 23 – PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA HA UTILIZADA



Na Figura 23, os picos marcados com estrela correspondem aos picos da hidroxiapatita

**Figura 24 – ESPECTROGRAMA DE INFRAVERMELHO DA HA**



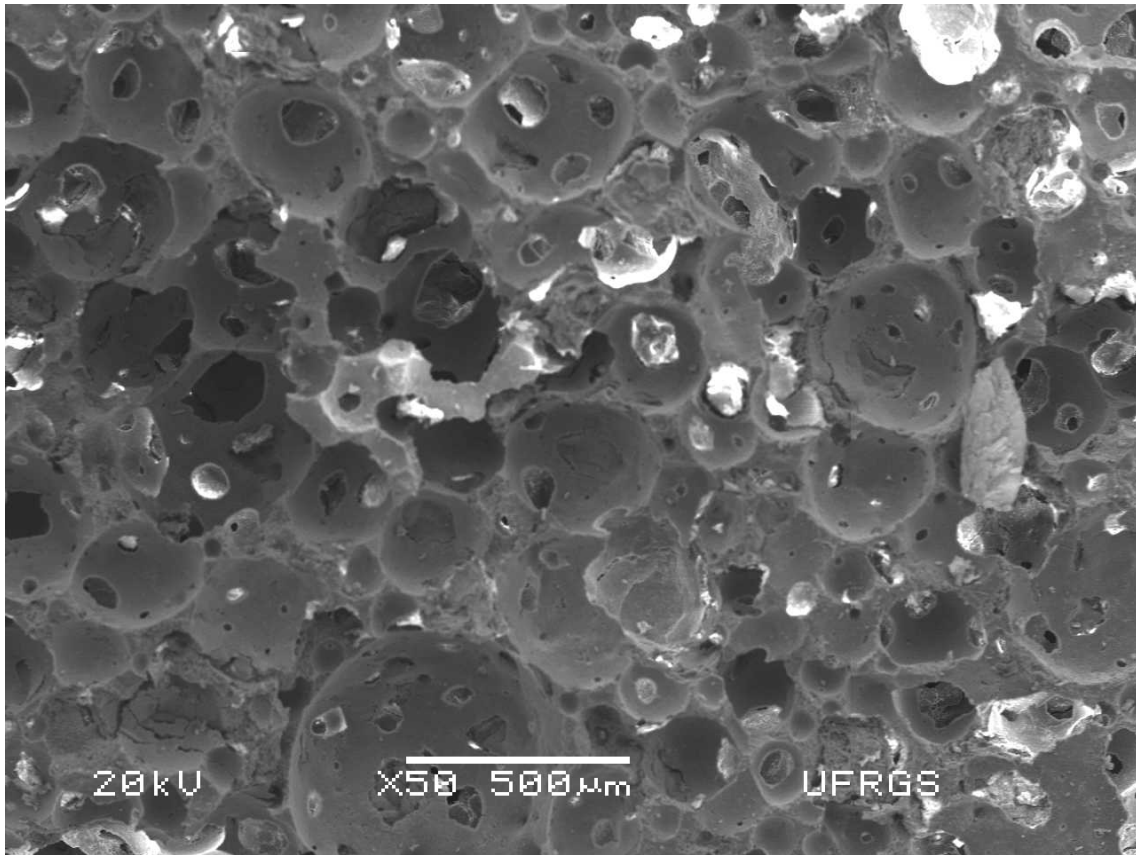
A Tabela 1 mostra o tamanho médio de poros, o comportamento trimodal da distribuição de tamanho de poros e a porosidade dos blocos obtidos.

**Tabela 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA HA**

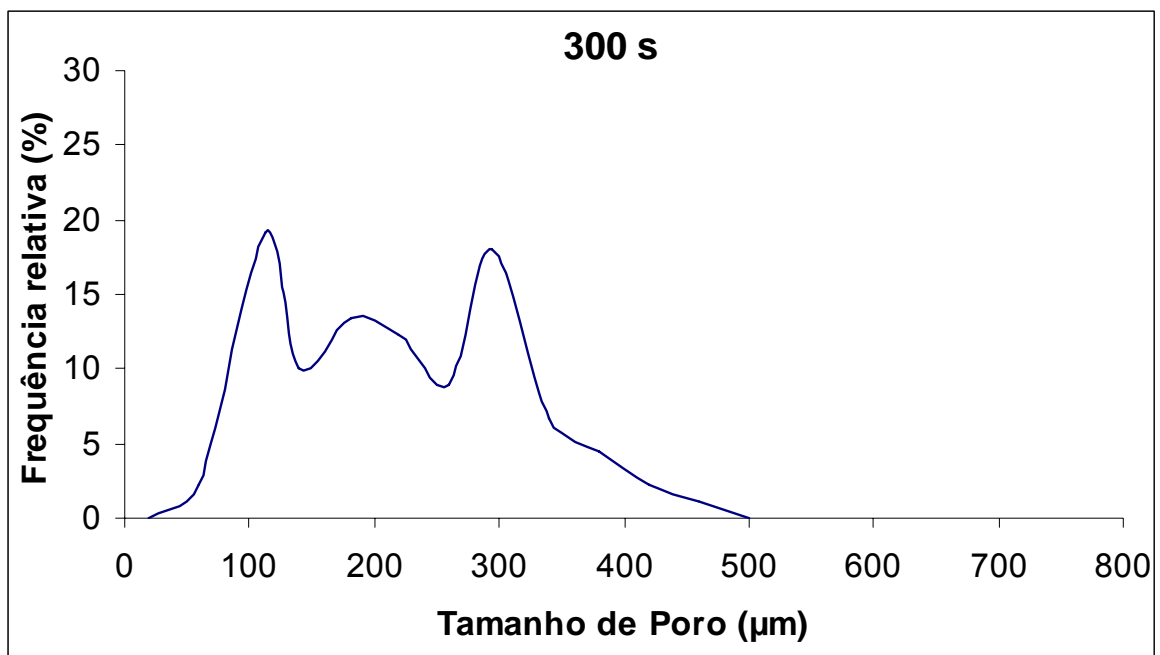
	<b>Característica da HA</b>
<b>Tamanho Médio (µm)</b>	195
<b>Desvio Padrão</b>	81
<b>Tamanho Modal (µm)</b>	132 – 182 - 255
<b>Porosidade</b>	86%



**Figura 25 – MICROGRAFIA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**



**Gráfico 1 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS POROS**



## ANEXO IV

### Protocolo dos Procedimentos Cirúrgicos

ANIMAL n		(1 a 45)
CAIXA		(1 a 9)
RECONSTRUÇÃO		HA + CT grupo 1 HA + CT + VEGF grupo 2 OL + CT + VEGF grupo 3
COR DA CAUDA		PRETO VERMELHO VERDE AZUL SEM COR
TEMPO DE CIRURGIA		valores em minutos

O protocolo acima foi preenchido durante a realização de cada procedimento cirúrgico. Esses dados foram guardados e somente revelados após toda a análise bioquímica e histológica dos espécimes. Durante as análises, as amostras de cada animal foram identificadas pela caixa procedente (1 a 9) e cor da cauda (preto, vermelho, verde, azul e sem cor).



## ANEXO V

**Tabela 2 – DETALHAMENTO DA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA,  
SEGUNDO FERREIRA (1997)**

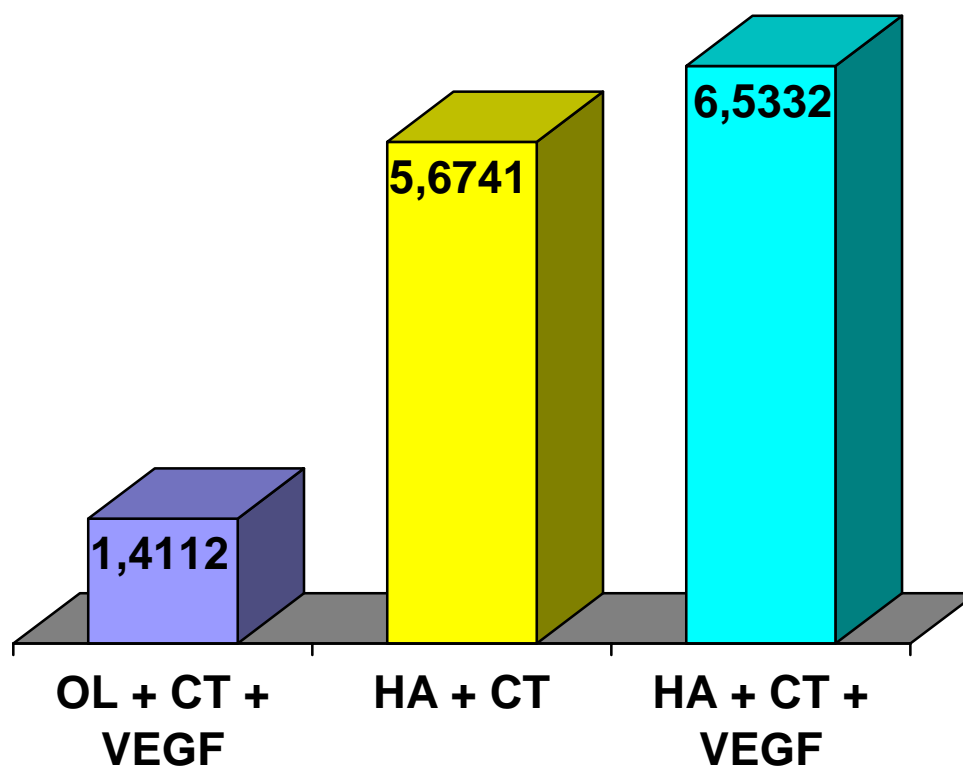
Critério	Pontuação	Descrição da Pontuação
Trabéculas ósseas neoformadas	0	Ausência de trabéculas neoformadas
	1	Trabéculas finas, isoladas, não ultrapassando 1/3 do campo microscópico
	2	Trabéculas isoladas ou anastomosadas, ocupando entre 1/3 e 2/3 do campo microscópico
	3	Trabéculas espessas, predominantemente anastomosadas, ocupando mais de 2/3 do campo microscópico
Atividade osteoblástica	0	Atividade inexistente
	1	Menos de 1/3 das trabéculas neoformadas apresentam atividade osteoblástica
	2	Atividade observada entre 1/3 e 2/3 das trabéculas ósseas neoformadas
	3	Mais de 2/3 das trabéculas neoformadas apresentam atividade osteoblástica
Atividade osteoclástica		Número absoluto na maior contagem de três campos de 400x.
Absorção do transplante	0	Ausência de áreas de lise óssea; 100% do transplante estava presente
	1	Reabsorção de até 1/3 do transplante
	2	Reabsorção entre 1/3 e 2/3 do transplante
	3	Reabsorção de mais de 2/3 do transplante
Viabilidade da medula óssea	0	Ausente
	1	Presente

**Tabela 3 – RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE FA**

Caixa	Tipo Reconstrução	Cor da Cauda	FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg osso}$ )
C 1	HA + CT	preta	11,27
C 1	HA + CT + VEGF	verde	20,50
C 1	HA + CT + VEGF	azul	33,10
C 2	OL + CT + VEGF	azul	0,80
C 2	OL + CT + VEGF	verde	0,13
C 2	HA + CT + VEGF	preta	9,32
C 2	HA + CT	vermelha	3,03
C 2	HA + CT + VEGF	nenhuma	15,47
C 3	OL + CT + VEGF	preta	1,25
C 3	HA + CT	azul	3,23
C 3	HA + CT	vermelha	5,75
C 3	HA + CT	verde	7,71
C 3	OL + CT + VEGF	nenhuma	2,36
C 4	HA + CT	nenhuma	12,67
C 4	HA + CT	azul	9,12
C 4	HA + CT + VEGF	verde	3,77
C 4	HA + CT + VEGF	vermelha	5,95
C 4	HA + CT + VEGF	preta	11,41
C 5	HA + CT	nenhuma	13,26
C 5	OL + CT + VEGF	azul	2,98
C 5	HA + CT + VEGF	verde	5,78
C 5	HA + CT	vermelha	8,28
C 5	OL + CT + VEGF	preta	1,47
C 6	OL + CT + VEGF	azul	2,04
C 6	HA + CT	nenhuma	5,57
C 6	HA + CT + VEGF	verde	1,89
C 6	OL + CT + VEGF	vermelha	1,10
C 6	OL + CT + VEGF	preta	7,55
C 7	OL + CT + VEGF	nenhuma	1,41
C 7	HA + CT	azul	1,85
C 7	OL + CT + VEGF	verde	0,59
C 7	HA + CT	vermelha	2,51
C 7	HA + CT + VEGF	preta	5,79

Caixa	Tipo Reconstrução	Cor da Cauda	FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg osso}$ )
C 8	HA + CT	nenhuma	5,48
C 8	OL + CT + VEGF	azul	1,45
C 8	OL + CT + VEGF	verde	0,64
C 8	HA + CT	vermelha	3,65
C 8	HA + CT + VEGF	preta	7,12
C 9	HA + CT + VEGF	azul	32,86
C 9	HA + CT + VEGF	verde	1,97
C 9	HA + CT	vermelha	5,67
C 9	HA + CT + VEGF	preta	2,37

**Gráfico 2 – MEDIANAS DA EXPRESSÃO DA FA NOS GRUPOS DE ESTUDO**



Valores da FA expressos em  $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$  osso

**Tabela 4 – MEDIANAS, PERCENTIL 25 (P25) E PERCENTIL 75 (P75) DA EXPRESSÃO DE FA NOS GRUPOS DE ESTUDO**

Grupo de estudo		FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$ osso)
OL + CT + VEGF	mediana	1,4112
	P(25)	0,7155
	P(75)	2,2017
HA + CT	mediana	5,6741
	P(25)	3,2261
	P(75)	9,1236
HA + CT + VEGF	mediana	6,5332
	P(25)	3,4226
	P(75)	16,7256

**Tabela 5 – RESULTADOS OBTIDOS NA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA, SEGUNDO FERREIRA (1997)**

<b>Caixa</b>	<b>Cor da Cauda</b>	<b>Pontuação</b>
C2	azul	3
C2	verde	11
C3	sem cor	4
C3	preta	4
C5	preta	9
C5	azul	6
C6	azul	4
C6	vermelha	4
C6	preta	8
C7	sem cor	4
C7	verde	0
C8	verde	9
C8	azul	5

Os dados apresentados referem-se aos 13 animais do grupo que recebeu OL como matriz óssea inorgânica e que portanto preencheram os critérios de análise da escala.

**RECONSTRUÇÃO ÓSSEA EXPERIMENTAL DE CALOTA CRANIANA COM  
ENXERTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E FATOR DE  
CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL EM MATRIZ DE HIDROXIAPATITA E  
OSSO LIOFILIZADO<sup>1</sup>**

Marcelo Mattana, MD<sup>2</sup>

Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD<sup>3</sup>

Ciro Paz Portinho, MD, MSc<sup>4</sup>

Flávia Helena Silva, MSc<sup>5</sup>

Carmen Pilla, MSc, PhD<sup>6</sup>

Luíse Meurer, MD, MSc, PhD<sup>7</sup>

Daniela Ravizzoni Dartora<sup>8</sup>

Luis Alberto dos Santos<sup>9</sup>

*1. Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED-UFRGS), RS, Brasil.*

*2. Médico. Neurocirurgião. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED-UFRGS.*

*3. Médico. Cirurgião Plástico. Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da FAMED-UFRGS. Chefe da Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA.*

*4. Médico. Cirurgião Plástico. Mestre em Cirurgia pela FAMED-UFRGS*

*5. Bióloga. Geneticista. Mestre em Genética - Departamento de Genética – Instituto de Biociências – UFRGS.*

*6. Farmacêutica. Chefe do Laboratório de Patologia Clínica – Centro de Pesquisa – HCPA.*

*7. Médica. Patologista. Professora do Departamento de Patologia – FAMED – UFRGS.*

*8. Acadêmica de Biomedicina – FEEVALE.*

*9. Engenheiro Mecânico. Chefe do Laboratório de Biomaterias – Engenharia de Materiais UFRGS.*

Endereço para separatas:

Rua Santos Dumont, 711, 1101

Bairro Exposição

CEP 95084 – 390

Caxias do Sul – RS

Fone: 55 54 3025 3468 / 3221 5772 / 9129 1294

FAX: 55 54 3202 9030

E-mail: [marmattana@terra.com.br](mailto:marmattana@terra.com.br)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Na prática neurocirúrgica, a craniotomia é etapa fundamental do procedimento cirúrgico. O crânio tem a função básica de estojo protetor do encéfalo, nas situações de falha óssea da caixa craniana nos deparamos com o risco aumentado de traumatismo encefálico e, normalmente, com um grave defeito estético. Dentre as causas de falhas ósseas no crânio encontramos o trauma como a mais freqüente, seguido das craniotomias descompressivas, infecções, neoplasias e defeitos congênitos. Inúmeros estudos têm sido feitos com o intuito de procurar materiais de substituição óssea adequados. A engenharia tecidual (ET) pesquisa novas formas de produção tecidual, inclusive para uso em cirurgias reparadoras. A ET é multidisciplinar e compreende todos os métodos e esforços para projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos específicos em locais específicos. As células-tronco (CT) podem ser empregadas em ET e contribuir para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos. A inflamação aumenta a produção do peptídeo derivado de macrófagos PR-39. Este inibe a degradação de HIF-1alfa (hypoxiainducible factor 1 alfa), o que leva a aumento da expressão de VEGF (vascular endothelium growth factor), a inflamação induz a produção de citocinas promotoras de angiogênese

**OBJETIVO:** Analisar a capacidade de integração e regeneração de enxertos ósseos, contendo CT mesenquimais indiferenciadas, enriquecidas ou não de VEGF. Comparar diferentes materiais de substituição óssea contendo CT mesenquimais indiferenciadas enriquecidas ou não de VEGF. Mensurar a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) na reconstrução com CT enriquecidas ou não de VEGF.

**MÉTODO:** Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6, adultos, fêmeas. Uma falha óssea no osso parietal esquerdo, de espessura total 5 mm x 3 mm, foi criada para o estudo da reconstrução óssea. Foram estudados três grupos compostos de: grupo 1 – 15 espécimes com colocação do bloco de HA na falha óssea produzida em cultura de CT (HA + CT), Grupo2 – 15 espécimes com colocação do bloco de HA na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (HA + CT + VEGF) e grupo 3 –15 espécimes com colocação do bloco de OL na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (OL + CT + VEGF). Os animais foram sacrificados quatro semanas após as reconstruções e o enxerto colocado foi dividido ao meio para análise bioquímica e histológica.

**RESULTADOS:** A prevalência da atividade presente da enzima fosfatase alcalina



(FA) nas amostras avaliadas foi considerada entre os grupos. O grupo com maior atividade enzimática foi HA + CT + VEGF ( $P < 0,0001$ ). A análise histológica foi realizada utilizando-se os seguintes critérios: trabéculas ósseas neoformadas; atividade osteoblástica; absorção do transplante; viabilidade da medula óssea. Também foi avaliada em separado a atividade osteoclástica. As lâminas com HA foram submetidas à coloração de picrossírius. CONCLUSÃO: A atividade da enzima FA verificada comprova que as reconstruções ósseas de HA acrescidas de CT e VEGF apresentam um elevado metabolismo de neoformação óssea. A análise histológica indica um material indicativo de uma matriz óssea muito jovem e abundante nos grupos com HA.

DESCRITORES: transplante ósseo; osso liofilizado; hidroxiapatita; células-tronco; vascular endothelium growth factor.

## INTRODUÇÃO

Na prática neurocirúrgica, a craniotomia é etapa fundamental do procedimento cirúrgico. É por meio dela que o conteúdo encefálico é acessado. Wagner, em 1889, descreveu a craniotomia osteoplástica nos moldes como é realizada até hoje (Gusmão, 2000).

O crânio tem a função básica de estojo protetor do encéfalo, nas situações de falha óssea da caixa craniana nos deparamos com o risco aumentado de traumatismo encefálico e, normalmente, com um grave defeito estético. Dentre as causas de falhas ósseas no crânio encontramos o trauma como a mais freqüente, seguido das craniotomias descompressivas, infecções, neoplasias e defeitos congênitos (Youmans, 2003).

O uso de materiais aloplásticos para cranioplastia teve seu início na prática da neurocirurgia na 2ª Guerra Mundial com a introdução do tântalo e do metilmetacrilato, sendo este, o material mais utilizado para cranioplastia atualmente (Youmans, 2003).

A literatura está repleta de estudos clínicos e laboratoriais (Delacure, 1994; Ferreira, 1997; Silva, 2000; Conrad, 1993; Lemperle, 1998; Deluca, 1997; Isaksson, 1992; Ozaki, 1999; Perry, 1999) que mostram a superioridade dos enxertos membranosos e as vantagens da utilização de osso isotópico, que se adapta melhor ao sítio receptor (Fukuta, 1992).

O osso autógeno é freqüentemente utilizado como enxerto para reparar defeitos cranianos. Sua sobrevivência como enxerto depende da invasão de capilares e osteoblastos do osso receptor. A integração do enxerto é influenciada pela fixação óssea, pela substituição da dura máter, por aplicação de cera óssea na díploe circunjacente e vascularização do escalpo.

Quando um enxerto ósseo é colocado num defeito craniano, temos uma situação similar a uma craniotomia osteoplástica devido ao interrompimento total aporte sanguíneo. O retalho ósseo reimplantado numa craniotomia e um enxerto ósseo de qualquer natureza são percebidos como um corpo estranho. Se o enxerto ósseo permanecer sem vascularização ele será encapsulado e reabsorvido. O risco de infecção aumenta e existe a eventual necessidade de retirada do implante. No entanto, quanto mais vascularizado torna-se o implante a partir do osso circunjacente, mais resistente à infecção ele fica (Youmans, 2003).

Diferentes estudos têm sido feitos no intuito de procurar materiais de substituição óssea (MSO) adequados. Em situações de extenso déficit ósseo, ou mesmo em situações que se buscam diminuir o tempo e a morbidade cirúrgica, alternativas vêm sendo buscadas. Os requisitos para um MSO ideal são: estimular a regeneração e a consolidação óssea, proporcionar resistência fisiológica, permanecer observável (ter contraste radiográfico), ser obtido prontamente, ser fácil de usar, não causar reação inflamatória em tecidos adjacentes, não levar à encapsulação de tecido conjuntivo, não desencadear transformação maligna, não produzir subprodutos tóxicos, não ter propriedades galvânicas ou eletrolíticas e não proporcionar mecanismos facilitadores de infecções (Sailer, 2000).

Uma possibilidade atual é a utilização de material proveniente de bancos de tecidos. Na última década, o uso clínico de homoenxertos ósseos atingiu 355.000 casos por ano (Jinno, 2000). Destes, estima-se que 200.000 são para uso médico e o restante para uso odontológico (Zasacki, 1991). Aproximadamente 10 a 15% das cirurgias ortopédicas realizadas nos EUA a cada ano envolvem alguma forma de enxerto ósseo (referido por Macedo, 1999).

Os biomateriais da hidroxiapatita (HA) são osteocondutivos, mas não intrinsecamente osteoindutivos. Esses materiais são biocompatíveis; apresentam, contudo, um desempenho biofísico inadequado em termos de remodelação, podendo haver migração, deiscência, ulceração e extrusão. A ossificação com esses materiais costuma ocorrer nos limites da zona receptora, sem migração para as áreas mais internas do enxerto (Ferreira, 1997). Aqui parece estar um limite de integração e regeneração a ser estudado e transposto com novas técnicas, como a associação de culturas celulares (Fukuta, 1992).

Atualmente, uma área nova de pesquisa biomédica, denominada engenharia tecidual (ET), estuda novas formas de produção tecidual, inclusive para uso em cirurgias reparadoras (Chang, 2003). A ET é multidisciplinar e compreende todos os métodos e esforços para projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos específicos em locais específicos (Goessler, 2005). A manipulação poderá ser de células, matrizes ou de estímulos biológicos (Muschler, 2002).

Os princípios biológicos que embasam a ET tornaram-se um campo de grande interesse na pesquisa biomédica. As pesquisas em ET cresceram de maneira vertiginosa nos últimos dez anos, porque se descobriu que há grande potencial para a regeneração e fabricação de tecidos (Goessler, 2005).

As técnicas de ET, combinadas à terapia gênica, podem melhorar a osteogênese e a fabricação de enxertos ósseos. Mais importante do que isso, a ET está tornando-se uma realidade clínica.

Nos últimos anos, o conceito do uso potencial das células-tronco (CT), de origem embrionária ou de organismo adulto, introduziu novas perspectivas em tratamento celular de patologias teciduais (Jones, 2004).

As CT mesenquimais já foram denominadas células estromais ou sustentação da medula óssea (MO). Pareciam surgir de uma matriz complexa de estruturas encontradas neste órgão. Sua função era restrita a servir de camada de suporte para as CT hematopoiéticas (Pereira, 1998). Pesquisas da última década, porém, evidenciaram que a CT mesenquimal tem funções muito mais importantes (Sylvester, 2004). Ela é capaz de se diferenciar em qualquer linhagem mesenquimal e também de sofrer um processo de transdiferenciação celular a outras linhagens, como a de células nervosas (origem ectodérmica) (Batouli, 2003; Conrad, 2005; Meirelles, 2003).

A indução da diferenciação – aplicada à área de regeneração óssea – pode ser feita apenas colocando-se a CT mesenquimal em meios apropriados de cultivo, considerados osteoindutores.

A adição de fatores de crescimento e outras substâncias pode melhorar a regeneração e a integração de enxertos ósseos contendo CT (Ozturk, 2005).

A atuação da ET pode ser revolucionária na produção de enxertos ósseos. Talvez seja possível a utilização de grandes quantidades de osso autógeno através da associação de cultivos celulares associados à MSO. A área doadora para estes casos poderia ser uma pequena amostra tecidual, ou mesmo um pequeno número de células. Além disso, o planejamento e a moldagem (prototipagem) do enxerto podem ser aperfeiçoados e melhor utilizados.

Os estudos, utilizando abordagens experimentais distintas, estabeleceram que as culturas de CT mesenquimais contêm estágios distintos de diferenciação. O estímulo do microambiente pode provocar a diferenciação dessas células a osteoblastos (Minguel, 2001).

O processo de angiogênese ocorre por estágios, que, resumidamente, compreendem: dilatação do vaso, ativação de células endoteliais, ativação de plaquetas, secreção de ativadores do plasminogênio e enzimas proteolíticas, desgranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, ruptura da membrana basal

e aumento de permeabilidade com saída de fibrina e outras proteínas (estágio 1). A seguir, ocorre formação de pseudópodos, degradação da matriz extracelular, migração de células endoteliais para o espaço extravascular com proliferação das mesmas e formação de brotos de tecido vascular (estágio 2). Por fim, forma-se nova membrana basal e maturação da nova parede vascular para estabelecimento do fluxo sanguíneo, formação de tubos e conexões, estabelecendo-se os novos vasos (estágio 3).

O processo pelo qual a hipóxia e a inflamação induzem à angiogênese está parcialmente esclarecido. Em resumo, sabe-se que a inflamação aumenta a produção do peptídeo derivado de macrófagos PR-39. Este inibe a degradação de HIF-1alfa (hypoxiainducible factor 1 alfa), o que leva a aumento da expressão de VEGF (vascular endothelium growth factor), seus receptores Flt1 e Flk1 e da sintetase de óxido nítrico (eNOS). Por outro lado, o PR- 39 aumenta a produção de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais têm poder angiogênico. Ainda por outro caminho, a inflamação induz a produção de citocinas promotoras de angiogênese.

As duas famílias de fatores mais bem estudadas, que participam do processo acima descrito, são as de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e as de fator de crescimento fibroblástico (FGF). O membro melhor identificado da família VEGF é VEGF-A, que consiste de 5 isoformas, resultantes de divisões alternativas de um gen único, ou sejam: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 e VEGF 206. A família FGF compreende pelo menos 9 polipeptídeos, incluindo FGFbásico e FGFácido. Diferentemente do VEGF, FGF atua na mitogênese de células endoteliais, de fibroblastos e de células musculares lisas (Kalil, 2004).

## **MÉTODO**

Um estudo experimental, aberto, comparado e prospectivo foi delineado. A pesquisa foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participaram do projeto a Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial – Cirurgia Plástica – HCPA, o Banco de Ossos – Serviço de Ortopedia e Traumatologia – HCPA, o Laboratório de Biomaterias – Faculdade de Engenharia da UFRGS, o Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS, a Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa

(CP) – HCPA, o Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina – UFRGS e o Serviço de Patologia Clínica – CP – HCPA.

Foram utilizados 45 camundongos adultos, fêmeas, da linhagem isogênica C57BL/6, com dois meses de vida e peso entre 20g e 80g. Foram obedecidas todas as normas de bioética estabelecidas pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – HCPA, da Unidade de Experimentação Animal – CP – HCPA e do *National Institutes of Health (NIRC)*.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com técnica microcirúrgica e auxílio de microscópio. Após a indução anestésica, a tricotomia e o posicionamento, foi realizada uma incisão em forma de meia-lua na região biparietal com levantamento de um retalho cutâneo expondo a região parietal direita do animal. Com um dissector delicado foi descolado o periósteo. Foram criadas falhas ósseas com uso de broca cirúrgica do tipo lâmina de craniótomo *Midas Rex Legend 8TA11 1714E* de espessura total na região do osso parietal, a serem reconstruídas no mesmo tempo cirúrgico por diferentes maneiras, de acordo com cada grupo em estudo. Em seguida, um descolador de periósteo delicado foi empregado para abrir a falha, minimizando lacerações meníngeas.

Por meio de um estudo-piloto, foi demonstrado que uma falha de 3mm x 5 mm pode ser utilizada, sem que haja o viés da regeneração total espontânea da falha – como demonstrado em estudo anterior da mesma linha de pesquisa (Portinho, 2006). A falha óssea do estudo não envolveu as suturas cranianas, que têm sabidamente um comportamento biomolecular diferente das outras regiões do osso craniofacial (Alberius, 1990).

Os animais foram sacrificados após quatro semanas de pós-operatório em câmara de CO<sub>2</sub> (Biotécnicas, São Paulo, SP), conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa – HCPA. O período de quatro semanas foi escolhido porque já foi demonstrado que a osteogênese de enxertos inicia-se entre duas e quatro semanas de pós-operatório (Batouli, 2003).

Os blocos de OL, provenientes do Banco de Ossos do HCPA, foram confeccionados no formato retangular, com a espessura o mais delgada possível no intuito de se aproximarem ao máximo do tamanho da falha óssea que preencheriam. Esses blocos foram esterilizados em autoclave e encaminhados para a cultura celular.

A HA utilizada no trabalho foi precipitada no laboratório de biomateriais da UFRGS pelo método da Via-Úmida com o uso de defloculantes. Os blocos de HA foram confeccionados no formato retangular, com a espessura o mais delgada possível no intuito de se aproximarem ao máximo do tamanho da falha óssea que preencheriam. Esses blocos foram esterilizados em autoclave e encaminhados para a cultura celular.

Os grupos de estudo foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo 1:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de HA na falha óssea produzida em cultura de CT (HA + CT).
- **Grupo 2:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de HÁ na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (HA + CT + VEGF).
- **Grupo 3:** composto de 15 espécimes com colocação do bloco de OL na falha óssea produzida em cultura de CT enriquecidas com VEGF (OL + CT + VEGF).

Como o trabalho está inserido em uma linha de pesquisa, os grupos OL + CT e o grupo controle (craniotomia e recolocação da falha óssea) já foram realizados em experimento anterior ao descrito.

As culturas de CT foram realizadas no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS. As CT foram isoladas a partir de um aspirado de medula óssea. Os cultivos celulares utilizados foram de baixa densidade, para isolar as CT mesenquimais. O isolamento e a preparação das culturas celulares previamente à colocação na matriz óssea seguiu o protocolo de Meirelles e Nardi (2003). A concentração celular em cada amostra foi de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/ml.

A proliferação das colônias foi realizada sem adição de fatores de crescimento, conforme descrito por Zvaifler e cols. (2000). Para a separação das CT mesenquimais a partir do aspirado de medula óssea, foram utilizadas as propriedades biológicas das CT mesenquimais e as do meio de cultura empregado (aderência x sobrenadante).

O VEGF utilizado no experimento foi o VEGF humano 165 (Genetech USA) gentilmente cedido pelo Dr. Renato Kalil que tem uma linha de pesquisa com o VEGF em cardiologia e detém os direitos sobre o uso do mesmo. O método de transfecção foi realizado conforme o protocolo de Jacobsen (2003) e Jordan (2003).

As cirurgias foram realizadas em 3 dias, na proporção de 15 animais por dia, com intervalo de duas semanas entre elas. No primeiro dia (D1) foram operados os

animais das caixas 1, 2 e 3. No segundo dia (D2), os animais das caixas 4, 5 e 6 e no terceiro dia (D3) foram operados os animais das caixas 7, 8 e 9.

Os blocos de matriz óssea enriquecidos com as culturas celulares foram colocados em placas de 24 poços, com a identificação do conteúdo de cada poço. Em cada dia de cirurgia foram utilizados, de forma aleatória, os três tipos de métodos de reconstrução a serem investigados.

Os procedimentos de indução anestésica e a criação da falha óssea foram realizados sem o conhecimento prévio sobre qual método de reconstrução seria empregado. Após o término da craniotomia, ou seja, imediatamente antes de iniciar a reconstrução óssea, foi realizado um sorteio para a escolha do tipo de reconstrução empregada. Esse dado foi anotado e a reconstrução sorteada realizada. Após o término do procedimento cirúrgico e da aplicação da analgesia subcutânea com tramadol, um novo sorteio foi realizado para identificar o animal por meio da pintura de sua cauda. Como haviam 5 animais por caixa, foram utilizados 5 tipos de identificação baseados em 4 cores: PRETO, VERMELHO, AZUL, VERDE e SEM COR. Portanto, em cada caixa (caixas 1 a 9) de 5 animais foi colocado um animal de cada cor e cada animal teve, por sorteio, sua alocação nos grupos de pesquisa.

Os animais foram sacrificados (conforme protocolo do Centro de Pesquisas do HCPA) após quatro semanas de pós-operatório. Estudos prévios demonstraram cicatrização óssea significativa a partir de duas a quatro semanas após a colocação do enxerto (Brodie, 2005; Batouli, 2004; Lohmann, 2001; Schwartz, 1996). O bloco de osso enxertado na falha óssea foi retirado (por osteotomias), sem margem de osso além do enxerto para evitar obliquidade na aferição da FA. Metade do fragmento ósseo retirado foi colocado em formalina e levado à preparação histológica com hematoxilina-eosina (HE). A outra metade foi colocada em soro fisiológico e transportada imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica – CP – HCPA, para análise da FA (Figura 15).

As lâminas histológicas foram descalcificadas com óxido nítrico a 10% e coradas com HE para avaliação por microscopia óptica. A análise foi executada no Serviço de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, por um patologista “cegado”.

A análise histológica das lâminas contendo OL como matriz inorgânica foi realizada considerando a escala de Ferreira (1997), que utiliza os seguintes critérios:



1. trabéculas ósseas neoformadas (0 a 3);
2. atividade osteoblástica (0 a 3);
3. atividade osteoclástica (número absoluto em campo de 400 vezes);
4. absorção do transplante (0 a 3);
5. viabilidade da medula óssea (0 ou 1).

A escala incluía, originalmente, o critério de fusão de corticais. Tal critério foi excluído por não poder ser aferido, uma vez que o bloco de OL foi retirado sem margens do osso nativo, a fim de não prejudicar as aferições bioquímicas.

O critério de atividade osteoclástica foi estratificado e analisado em separado, já que se tratava de um número absoluto, tendo muito mais peso do que os outros critérios para o somatório final.

A análise histológica das lâminas contendo HA como matriz inorgânica, por não preencherem critérios de neoformação óssea que pudessem ser aplicados na escala de Ferreira (1997), foi realizada pela técnica de coloração de picrossirius, que indica a presença de colágeno.

A atividade de FA foi expressa em unidade por minuto por miligrama de osso do enxerto. A enzima foi extraída das amostras com o auxílio de Triton 0,2% e sua atividade ensaiada de acordo com a padronização de Yoshikawa e cols. (1999), utilizando como substrato o p-nitrofenilfosfato (kit de diagnóstico Sera-Pak Bayer®, São Paulo, Brasil).

Através da análise de curvas de tempo e concentração, foi utilizado o mesmo tempo de incubação preconizado pelo fabricante de 30 minutos. Esta técnica já foi previamente utilizada na linha de pesquisa.

Os valores de atividade de FA foram obtidos por meio da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{FATOR X } \Delta\text{ABS} / \text{MASSA AMOSTRA} = \text{U/min/mg de osso}$$

O trabalho foi feito visando minimizar o sofrimento dos animais envolvidos. Em todos os procedimentos cirúrgicos, foi utilizada anestesia com quetamina e xilazina. A eutanásia, ao fim do experimento, foi feita com câmara de CO<sub>2</sub> T61 (Biotécnicas, São Paulo, SP). Os animais foram sacrificados pela necessidade do estudo da área óssea receptora. Não houve necessidade de sacrifício após a aspiração da medula óssea.

A análise estatística da FA foi feita da seguinte forma:

– Foi utilizado o teste de Kruskal-Walis para variáveis não paramétricas.

Uma diferença estatística foi considerada significativa sempre que o P for menor que 0,05. A análise estatística foi realizada com o auxílio do grupo de estatística do GPPG do HCPA de *softwares* específicos, como o SPSS® versão 11 do GPPG - HCPA.

A FA (variável não-paramétrica) foi apresentada também com a mediana e os percentis 25 (P25) e 75 (P75) de cada grupo do estudo.

## RESULTADOS

Dos 45 animais operados, os dois primeiros foram a óbito logo após a indução anestésica. Os procedimentos anestésicos foram iniciados utilizando-se medicações previamente diluídas que estavam devidamente armazenadas e dentro do seu período de validade. Após o óbito dos dois primeiros animais e da troca das medicações anestésicas não ocorreram mais óbitos.

Dois animais tiveram extrusão espontânea dos blocos colocados - com aparecimento na pele – que pode ser atribuída possivelmente a algum defeito no fechamento do retalho cutâneo (Figura 16). Em um animal não foi encontrado seu bloco de reconstrução no momento do sacrifício. Provavelmente isso se deve a uma extrusão cutânea do bloco e saída do sítio receptor. Estes animais foram excluídos do experimento.

Os valores de FA encontrados estão descritos na Tabela1. As análises realizadas apontam para um aumento significativo na expressão de FA, respectivamente nos grupos contendo OL em cultura de CT enriquecidas com VEGF (OL + CT + VEGF), HA em cultura de CT (HA + CT) e HA em cultura de CT enriquecidas com VEGF (HA + CT + VEGF) ( $P < 0,0001$ ).

**Tabela 1 – RESULTADOS DA EXPRESSÃO DE FA**

Caixa	Tipo Reconstrução	Cor da Cauda	FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$ osso)
C 1	HA + CT	preta	11,27
C 1	HA + CT + VEGF	verde	20,50
C 1	HA + CT + VEGF	azul	33,10
Caixa	Tipo Reconstrução	Cor da Cauda	FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$ osso)
C 2	OL + CT + VEGF	azul	0,80

C 2	OL + CT + VEGF	verde	0,13
C 2	HA + CT + VEGF	preta	9,32
C 2	HA + CT	vermelha	3,03
C 2	HA + CT + VEGF	nenhuma	15,47

C 3	OL + CT + VEGF	preta	1,25
C 3	HA + CT	azul	3,23
C 3	HA + CT	vermelha	5,75
C 3	HA + CT	verde	7,71
C 3	OL + CT + VEGF	nenhuma	2,36

C 4	HA + CT	nenhuma	12,67
C 4	HA + CT	azul	9,12
C 4	HA + CT + VEGF	verde	3,77
C 4	HA + CT + VEGF	vermelha	5,95
C 4	HA + CT + VEGF	preta	11,41

C 5	HA + CT	nenhuma	13,26
C 5	OL + CT + VEGF	azul	2,98
C 5	HA + CT + VEGF	verde	5,78
C 5	HA + CT	vermelha	8,28
C 5	OL + CT + VEGF	preta	1,47

C 6	OL + CT + VEGF	azul	2,04
C 6	HA + CT	nenhuma	5,57
C 6	HA + CT + VEGF	verde	1,89
C 6	OL + CT + VEGF	vermelha	1,10
C 6	OL + CT + VEGF	preta	7,55

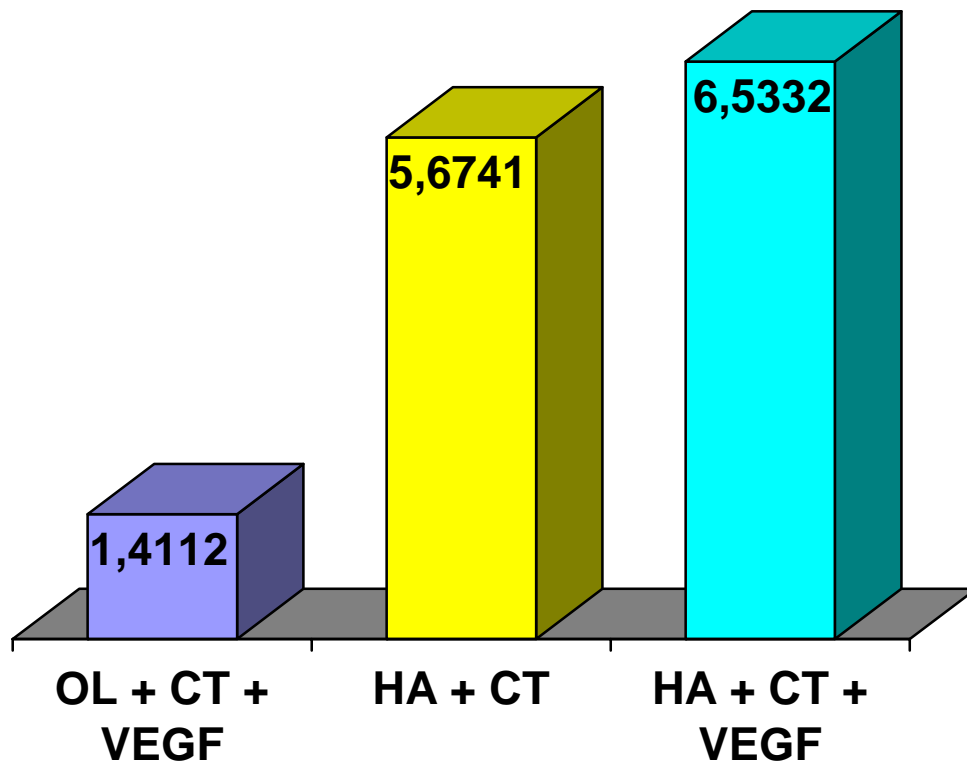
C 7	OL + CT + VEGF	nenhuma	1,41
C 7	HA + CT	azul	1,85
C 7	OL + CT + VEGF	verde	0,59
C 7	HA + CT	vermelha	2,51
C 7	HA + CT + VEGF	preta	5,79

C 8	HA + CT	nenhuma	5,48
C 8	OL + CT + VEGF	azul	1,45
C 8	OL + CT + VEGF	verde	0,64
C 8	HA + CT	vermelha	3,65
C 8	HA + CT + VEGF	preta	7,12

C 9	HA + CT + VEGF	azul	32,86
C 9	HA + CT + VEGF	verde	1,97
C 9	HA + CT	vermelha	5,67
C 9	HA + CT + VEGF	preta	2,37

O valor das medianas das dosagens de FA estão expressos no Gráfico 1 que mostra a presença significativa da FA no grupo da HA + CT e maior ainda no grupo HA + CT + VEGF em relação ao grupo OL + CT + VEGF.

**Gráfico 1 – MEDIANAS DA EXPRESSÃO DA FA NOS GRUPOS DE ESTUDO**



Valores da FA expressos em  $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$  osso

Os valores das medianas das dosagens de FA e os percentis 25 e 75 (P25 e P75) dos grupos de estudo estão dispostos na Tabela 2

**Tabela 2 – MEDIANAS, PERCENTIL 25 (P25) E PERCENTIL 75 (P75) DA EXPRESSÃO DE FA NOS GRUPOS DE ESTUDO**

Grupo de estudo		FA ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{mg}$ osso)
OL + CT + VEGF	mediana	1,4112
	P(25)	0,7155
	P(75)	2,2017
HA + CT	mediana	5,6741
	P(25)	3,2261
	P(75)	9,1236
HA + CT + VEGF	mediana	6,5332
	P(25)	3,4226
	P(75)	16,7256

A proposta inicial do trabalho foi de realizar a análise histológica utilizando-se a escala histológica de Ferreira (1997), excluindo-se o critério “fusão de corticais” seguindo os trabalhos da mesma linha de pesquisa que a utilizaram (Tabela 3).

No momento da análise, o patologista “cegado” percebeu que em algumas lâminas não havia uma formação óssea que permitisse a aplicação da escala proposta. Nas lâminas em que a matriz óssea era o OL, os critérios podiam ser preenchidos, mas nas lâminas em que a matriz era a HA esses critérios não se aplicavam. Estas amostras foram então, novamente coradas pelo método de picrossirius.

A análise histológica destas lâminas demonstrou a presença de colágeno, de um tecido granular com vasos proeminentes e de deposição de material fibrilar. Foi observado também um espessamento que aparentemente é o início de matriz óssea.

## DISCUSSÃO

No experimento, optou-se pelo uso de camundongos C57BL/6 para desenvolver e aprimorar o modelo animal criado pela linha de pesquisa em que o

trabalho está inserido. Pesquisas anteriores já haviam determinado que a falha de 3mm X 5 mm realizada no osso parietal é a falha crítica para esse camundongo. Reconstruções “padrão ouro”, ou seja, de recolocação do próprio osso do animal também já foram estudadas. Esta é a menor falha crítica de um modelo animal experimental já descrita.

Por meio da confecção pré-operatória dos blocos de OL e HA do tamanho o mais próximo possível da falha óssea criada, foi simulada uma “prototipagem” com a intenção de uma reconstrução ideal, onde a falha óssea é preenchida na sua totalidade. Este fator é fundamental na integração de uma reconstrução de falha óssea craniana (Youmans, 2003).

Como foram utilizados dois tipos de matriz óssea inorgânica (OL e HA) e também culturas de CT com e sem VEGF, foi desenvolvido um método de randomização da técnica de reconstrução e identificação do animal para que o procedimento operatório realizado fosse “cegado”. Assim, o cirurgião não teve o benefício de aprimorar a técnica cirúrgica ao longo do experimento para utilizá-la em um determinado grupo a ser estudado.

Foram utilizados animais adultos porque a regeneração é menor e porque há maior absorção óssea em imaturos (Delacure, 1994; Riley, 1996). A opção por fêmeas é justificada pela possibilidade futura de marcar o cromossomo Y, já que todas as culturas celulares do Laboratório de Imunogenética foram realizadas com células de machos.

Foi escolhida a FA como método de avaliação da neoformação óssea porque diferentes estudos descritos pela literatura comprovam sua eficácia (Sabokbar, 1994; Yoshikawa, 1999 e 2003; Stucki, 2001; Ge, 2004). Além disso, nesta linha de pesquisa, foram demonstrados resultados significativos, utilizando a mesma técnica em experimentos anteriores.

A FA é uma enzima que pode se originar de vários tecidos do organismo. No entanto, foi utilizado um método desenvolvido na linha de pesquisa onde a aferição de sua concentração é feita apenas no enxerto realizado, de forma que outras fontes não influíssem nos valores calculados.

Devido ao tamanho do fragmento retirado não foi desenvolvida ainda a possibilidade de realizar outras dosagens bioquímicas no fragmento, como a osteopontina e osteocalcina, enzimas que também expressam atividade óssea e ajudariam muito na análise dos resultados.

A maior expressão de FA nos dois grupos contendo a HA sugere uma atividade metabólica mais intensa em relação ao grupo do OL + CT + VEGF, apesar de na análise histológica não ter sido encontrado claramente osso neoformado. O material colagenóide ou de matriz óssea muito jovem encontrado nas lâminas de HA sugere que, juntamente com uma significativa expressão de FA, a reconstrução com a HA parece ser mais apropriada para a calota craniana do modelo estudado.

Experimentos de reconstrução da falha com OL em cultura de CT mostraram, pelos critérios bioquímicos da expressão da FA, e pela aplicação da escala histológica proposta, resultados favoráveis já na quarta semana de pós-operatório. Analisando esses dados e os estudos de Brodie e cols. (2005), Batouli e cols. (2004), Lohmann e cols. (2001) e Schwartz e cols. (1996) que demonstraram osteogênese percebida a partir de duas semanas de pós-operatório, foi decidido analisar todos os grupos com quatro semanas de pós-operatório.

Uma análise histológica de reconstruções com HA realizadas nos mesmos moldes do trabalho apresentado, realizadas com oito semanas de pós-operatório, possivelmente responderão se todo o material colagenóide encontrado nas lâminas de quatro semanas pode ser osso neoformado.

A atuação das CT na área de regeneração ainda precisa ser melhor estabelecida. Não está esclarecido se estas células são responsáveis por todo o processo de regeneração ou se, em algum momento, tornam-se apenas coadjuvantes. A utilização de genes repórteres poderá permitir tal esclarecimento. O grupo que continha o VEGF transfectado nas CT também mostrou uma expressão maior de FA em relação ao grupo sem VEGF com a mesma matriz (HA). O VEGF é um fator angiogênico e, portanto, parece também auxiliar no metabolismo de formação óssea. O papel do VEGF na formação óssea ainda não foi estabelecido. Estudos posteriores envolvendo angiogênese óssea poderão responder a essa questão.

O modelo de pesquisa utilizado não permite avaliar a resistência biomecânica do osso e esta investigação é fundamental para avaliar um tecido que serve principalmente para proteção na região craniana. Serão necessários experimentos com modelos animais de maior porte, que possibilitem estudos apropriados para análise da resistência biomecânica do osso regenerado.

A interação entre células e matrizes tem sido estudada e foi evidenciado que proteínas de adesão são necessárias para que a célula se estabeleça sobre uma

matriz. Hanks e Atkinson (2004) demonstraram que matrizes com expressão de moléculas de adesão apresentam maior capacidade de reter CT *in vitro* do que o OL simplesmente. Brodie e cols. (2005) comprovaram que a cobertura de matrizes de HA com colágeno tipo I aumentou a proliferação celular, provavelmente pela facilidade de adesão que foi criada. A falta de adesão pode levar à apoptose. As CT mesenquimais parecem ter um elevado potencial biológico. As técnicas de ET que utilizem CT e matrizes ósseas combinadas, preparadas antes de sua implantação na área a ser reconstruída, podem ser promissoras para cirurgias reparadoras do esqueleto craniofacial em seres humanos.

Estudos subseqüentes serão necessários para aperfeiçoar a integração, regeneração e diferenciação do tecido ósseo no esqueleto craniofacial com protocolos de ET.

## **CONCLUSÃO**

A atividade da enzima FA verificada comprova que as reconstruções ósseas de HA acrescidas de CT e VEGF apresentam um elevado metabolismo de neoformação óssea.

A comparação entre os diferentes materiais de substituição óssea estudados indica que a HA enriquecida com CT e VEGF tem um potencial biológico superior ao OL (mesmo enriquecido com CT e VEGF) e à HA enriquecida apenas com CT.

A partir dos resultados obtidos é possível indicar que a capacidade de integração e regeneração de enxertos ósseos contendo CT mesenquimais e VEGF é favorável do ponto de vista bioquímico e histológico.



**EXPERIMENTAL CRANIAL VAULT RECONSTRUCTION WITH MESENCHYMAL  
STEM CELL AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN  
HYDROXYAPATITE AND FREEZED-DRIED BONE<sup>1</sup>**

Marcelo Mattana, MD<sup>2</sup>

Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD<sup>3</sup>

Ciro Paz Portinho, MD, MSc<sup>4</sup>

Flávia Helena Silva, MSc<sup>5</sup>

Carmen Pilla, MSc, PhD<sup>6</sup>

Luíse Meurer, MD, MSc, PhD<sup>7</sup>

Daniela Ravizzoni Dartora<sup>8</sup>

Luis Alberto dos Santos<sup>9</sup>

*1. Craniomaxillofacial Division – Plastic Surgery Department – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Medicine School – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brasil.*

*2. MD. Neurological Surgeon.*

*3. MD, PhD. Plastic Surgeon. Head of Craniomaxillofacial Division – Plastic Surgery Department – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Professor of Surgery Postgraduate Program – Medical School – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).*

*4. MD. Plastic Surgeon.*

*5. Geneticist, MSc. Immunogenetics Laboratory – Genetics Department - UFRGS.*

*6. Head of Clinical Pathology Laboratory – Research Center – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.*

7. MD, MSc, PhD. Pathologist. Professor of Pathology Department – Medical School – UFRGS.

8. Biomedicine – FEEVALE

9. Engineer, PhD. Head of Biomaterials Laboratory – Materials Engineering – UFRGS.

Address:

Rua Santos Dumont, 711, 1101

Bairro Exposição

CEP 95084 – 390

Caxias do Sul – RS

Fone: 55 54 3025 3468 / 3221 5772 / 9129 1294

FAX: 55 54 3202 9030

E-mail: [marmattana@terra.com.br](mailto:marmattana@terra.com.br)

## ABSTRACT

The craniotomy is the basis of the neurosurgical procedure. The basic skull function is brain protection. Situations of bone defects in the skull lead to high risk of brain traumatism and severe esthetics disorders. Among the causes of skull defects trauma is the most commom, followed by decompressive craniotomies, infection, neoplasms and congenital defects. Tissue engineering (TE) studies new ways of tissue production, including for use in reconstructive surgeries. TE is multidisciplinary, it represents all the methods and efforts to project, produce, modify, expand and keep alive specific tissues in specific places. Stem cells (SC) can be used in TE and contribute for the repair and regeneration of tissues and organs. Inflammation increases the production of the macrophage-derived peptide PR-39. It inhibits the degradation of hypoxiainducible factor alfa 1 that leads an increase of vascular endothelium growth factor (VEGF) expression. Inflammation increases the production of citoquines that promote angiogenesis. Objective: Analyze the integration and regeneration capacity of bone grafts containing mesenquimal SC enriched or not with VEGF. Measure the activity of alkaline phosphatase (AP) in reconstructions with SC enriched or not with VEGF. Method: Isogenic, adults, females of C57BL/6 mice were used. A whole thickness failure measuring 5mm x 3 mm was performed in the right parietal bone. This failure was reconstructed in three different ways. The following groups (G) were studied: G1 – freeze-dried bone (FDB) in mesenquimal SC culture enriched with VEGF. G2 – Hydroxyapatite (HA) in mesenquimal SC culture. G3 – HA in mesenquimal SC culture enriched with VEGF. RESULTS: The prevalence of positive activity of alkaline phosphatase was considered among groups. The group with the highest number of positive samples was G3 ( $P < 0,0001$ ). Histological analysis was made according to the following criteria: new bone trabecules;

osteoblastic activity; graft absorption; bone marrow viability. Osteoclastic activity was analyzed separately. The specimens containing HA were submitted to picosirius coloration. CONCLUSION: The AP activity examined proves that the bone reconstructions with HA and ST enriched with VEGF show a high new bone metabolism. The histological analysis indicates a material very close to a young bone matrix.

KEYWORDS: bone graft; freeze-dried bone; hydroxyapatite; stem cells; vascular endothelial growth factor.

## INTRODUCTION

In neurological surgery practice craniotomy is a basic step of the surgical procedure. It is through the craniotomy that the brain is reached. Wagner, in 1889, first described the osteoplastic craniotomy as it is performed these days (Gusmão, 2000).

The skull has the basic function to protect the brain, in situations of skull defects there is an increase of brain traumatism and, generally a severe esthetic disorder. Among the causes of skull defects trauma is the most common, followed by decompressive craniotomies, infection, neoplasms and congenital defects (Youmans, 2003).

Literature has several clinical and experimental studies (Delacure, 1994; Ferreira, 1997; Silva, 2000; Conrad, 1993; Lemperle, 1998; Deluca, 1997; Isaksson, 1992; Ozaki, 1999; Perry, 1999), which demonstrate superiority of membranous autogenous bone grafts (ABG) and the advantages of isotopic bone usage, for it shows better adaptation to the receptor site (Fukuta, 1992).

Autogenous bone is frequently used as a graft to repair cranial defects. Its survival as a graft depends on the invasion of capillaries and osteoblasts from the receiver bone. Bone integration is influenced by these factors: bone fixation, dura mater substitution, use of bone wax and scalp vascularization.

When a bone graft is placed in a skull defect it works like an osteoplastic craniotomy due to total blood flow interruption. The bone graft and the craniotomy flap are identified as a strange body by the organism. If the bone graft remains without vascularization it will be encapsulated and reabsorbed. The infection risk and the need of graft removal become more real. Although, more vascularized becomes the graft more infection resistant it is (Youmans, 2003).

A great number of studies have been made in order to search for adjusted bone substitute materials (BSM). In such situations, when there's a great bone deficit, or even to diminish procedure duration and morbidity, alternatives are being searched. Requisites for an ideal BSM are (Sailer, 2000): stimulating bone regeneration and consolidation; proportionating physiologic resistance; remaining observable (which means having radiographic contrast properties); being promptly achieved; being easily utilized; it cannot initiate inflammatory reaction in nearby tissues; it cannot promote encapsulation of connective tissue; it cannot lead to malignant transformation; it cannot produce toxic sub products; it can have neither galvanic nor electrical properties; it cannot proportionate any mechanism which facilitates infections.

One possibility is the employment of any material derived from tissue banks. Storage bone usage has increased in the United States of America, from about 100,000 cases in 1971 to 250,000 in 1991 (Hardin, 1994; Ozaki, 1998). In the last decade, clinical utilization of bone homografts has reached 355,000 cases per year (Jinno, 2000). Among these, it is estimated that 200,000 cases were directed to medical usage and the rest to deontological usage (Zasacki, 1991). About 10 to 15% of orthopedic surgeries performed in USA every year involve any kind of bone graft (referred by Macedo, 1999).

Hydroxiapatite (HA) derived biomaterials are osteoconductive, but not intrinsically osteoinductive. Such materials are biocompatible, though they demonstrate an inappropriate biophysical performance for remodeling, with risk for migration, dehiscence, ulceration, and extrusion. Ossification of these materials usually occurs in the limits of the receptor area, with no migration for inner zones of the graft (Ferreira, 1997). There may be a limit at this point to be studied and

transposed in terms of integration and regeneration. Cell cultivation and its association to biomaterials may be an interesting solution (Fukuta, 1992).

Nowadays, a new area of biomedical research, known as tissue engineering (TE), studies new ways of tissue production, including those for reconstructive surgeries (Chang, 2003). TE is multidisciplinary and includes all of the methods and efforts to develop, produce, modify, expand and maintain alive specific tissues in specific sites (Goessler, 2005). Manipulation may be either in cell, matrix or biological stimuli (Goessler, 2005).

In the last years, the concept of the potential utilization of stem cells (SC), either embryonic or adult in origin, introduced new perspectives for the cellular treatment of tissue pathologies (Jones, 2004).

Mesenchymal SC have been already named as stromal or sustentation cell of bone marrow (BM). They seemed to be originated from a complex matrix of structures that were found in such organ. Their function was known as a support layer of cells for hematopoietic SC (Pereira, 1998). Researches from the last decade, however, demonstrated that mesenchymal SC have many and more important functions (Sylvester, 2004). They are capable of differentiating in any mesenchymal lineage, and also to suffer a process of cellular transdifferentiation to other lineages, like neural cells (ectodermic origin) (Batouli, 2003; Conrad, 2005; Meirelles, 2003).

Addition of new growing factors and other substances may improve regeneration and integration of SC-containing bone grafts (Ozturk, 2005).

The paper of TE may be revolutionary in producing bone grafts. It might be possible to use a great amount of autogenous bone, by association with cellular cultures and BSM. Donor area for these cases could be a little tissue sample or even

a few number of cells. Besides, the graft planning and modeling (prototyping) can be improved and better employed.

SC usage can also be associated to other techniques for regeneration and reconstruction of bone loss areas, such as bone distraction (Kitoh, 2004).

Interaction between cultivated cells and bone matrices has been another issue for research (Hanks, 2004). Extracellular matrix (ECM) mediates cell adhesion to biomaterials (El-Amin, 2003). In bone, ECM is composed by proteins, such as: collagen, fibronectin, laminin, vitronectin, osteopontin, and osteonectin. Besides the possibility of studying adhesion, these elements can be evaluated as indicators of tissue regeneration.

The studies that employ different experimental approaches have established that cultures of mesenchymal SC contain different stages of differentiation. The microenvironment stimulus may lead to differentiation till osteoblasts (Minguel, 2001).

Angiogenesis process occur trough stages: vessel dilatation, endothelial cells activation, platelet activation, plasminogen activators and proteolytic enzymes secretion, mastocytes degranulation, macrophage activation, basal membrane rupture and increase in the permeability with way out of fibrin and other proteins.

The rule of inflammation is unclear. Inflammation increases the production of the macrophage-derived peptide PR-39. It inhibits the degradation of hypoxia-inducible factor alpha 1 that leads an increase of vascular endothelium growth factor (VEGF) expression. Inflammation increases the production of cytokines that promote angiogenesis.

The two families of factor better studied who participate of this process are the vascular endothelial factor (VEGF) family and fibroblast growth factor (FGF) family.



The most known and studied is VEGF 165. Differently of VEGF, FGF acts on mitogenesis of endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells (kalil, 2004).

## METHOD

An experimental, open, comparative, and prospective study was assembled. The research was performed at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participated of the project: Craniomaxilofacial Surgery Unit – Plastic Surgery Division – HCPA, The Bone Bank – Orthopedics Division – HCPA, Biomaterials Laboratory – Engineering Faculty – UFRGS, Immunogenetics Laboratory – Genetic Department – UFRGS, Animal Experiment Unit – Research Center – HCPA, Pathology Department – Medicine Faculty – UFRGS and Clinical Pathology Department – HCPA.

There were used 45 adult female isogenic mice C57Bl/6 (FEPPS, Porto Alegre, Brazil). Animals were maintained in Animal Experimental Division (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil). Feeding was *ad libitum* and biological cycle was according to the protocols of that Institution.

All the surgical procedures were under microscopic technique. After animal anesthesia, antiseptis, tricotomy and positioning. A scalp flap was made, as the incision was made from the occipital to the right parietal area. This way, the bone work region remained not so close to the surgical wound, preventing exposure to the environment.

With a *Midas Rex Legend* 8TA11, a whole thickness failure was performed in right parietal bone, measuring 5mm x 3 mm. The original bone fragment was cautiously detached from dura mater, in order to prevent its laceration. A pilot study demonstrated that a failure with such dimensions is unable to close by itself. Cranial

sutures were not involved in the failure, for they have a different biological behavior (Alberius, 1990).

After four weeks, animals were sacrificed. A CO<sub>2</sub> gas chamber was used for that purpose (Figure 8) (Biotécnicas, São Paulo, Brazil), according to our Institute protocols. Such period was chosen based on other authors' studies (Batouli, 2003), who demonstrated significant osteogenesis in grafts even in two weeks.

FDB was supplied by HCPA Bone Bank (Porto Alegre, Brazil). Such division is regularized by Brazilian Health Ministry. The pieces of FDB were shaped the size of the cranial defect the would close, they sterilized and sent to cell culture.

HA was supplied by Biomaterials Laboratory (Porto Alegre, Brazil). The pieces of HA were shaped the size of the cranial defect the would close, they sterilized and sent to cell culture.

The groups of the research were:

Group 1 – FDB in mesenquimal SC culture enriched with VEGF (FDB + SC + VEGF)

Group 2 – Hydroxyapatite in mesenquimal SC culture (HA + SC)

Group 3 – HA in mesenquimal SC culture enriched with VEGF (HA + SC + VEGF)

Cell cultures were developed in Immunogenetic Laboratory (Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil). They were aspirated from murine BM. Cell cultures had a low density in order to isolate mesenchymal SC. Isolation and preparation, before mixture with bone matrices, followed the protocol established by Meirelles & Nardi (2003). Cell concentration for each sample was approximately  $5 \times 10^5$  cells/ml.

The VEGF used was human 165 VEGF (Genetech, USA) kindly granted by Dr Renato Kalil who heads a research line in cardiology and has the right to use this factor. The transfection method was followed the protocol of Jacobsen (2003) and Jordan (2003).

The surgeries were performed in three days, 15 animals per day with an interval of two weeks. On the first day the animals from boxes 1, 2 and 3 were operated. On the second day, the animals from boxes 4, 5 and 6 and on the third day the animals from boxes 7, 8 and 9 were operated.

The grafts with the cultures were placed in a plaque with 24 wells with the identification of which reconstruction method it was. In each day of surgery it was used in an alleatory fashion all three kinds of reconstruction.

The anesthesia and craniotomy were performed without the knowledge about which reconstruction method it would be used. Just before the reconstruction be made a raffle was performed and the reconstruction done. After the end of the surgery another raffle was made to identify the mouse by painting the tail. As we had 5 mice per box we defined four colors to create five categories: BLACK, BLUE GREEN, RED and NO COLOR. So, we had 9 boxes with 5 animals identified by the color of the tail and with a random selection in the groups of the research.

At the sacrifice the grafts were removed by osteotomies without any donor bone, only graft was removed. The piece was divided in two, half to biochemical analysis with AP and half to histological analysis.

A histological scale described by Ferreira e cols. (1997) was used previously. Such scale has the following criteria:

1. New bone trabecules (0 to 3);
2. Osteoblastic activity (0 to 3);

3. Osteoclastic activity (absolute number in a 400-time amplification optic field);
4. Graft absorption (0 to 3);
5. Bone marrow viability (0 or 1).

Originally, it included another condition that was the cortical bone fusion. Such feature was excluded because the native bone borders were not removed together with graft block. Also, osteoclastic activity was stratified and analyzed apart from the other features.

The activity of alkaline phosphatase (AP) was expressed as unity by micrograms per milligram of bone graft. To do it straight from the bone, a technical standardization was necessary, according to Yoshikawa et al. (1999). Enzyme was extracted from bone using Triton 0.2%; activity was assayed by using p-nitrophenylphosphate as substrate (Sera-Pak Bayer, São Paulo, Brazil). AP concentration was calculated by the following formula:

$$[\text{Factor} \times (\Delta \text{ABS}) \times 100] / \text{sample weight} = \text{U/min/mg bone}$$

Statistical analysis was made with Kruskal-Wallis non-parametric variables test, determined if  $P < 0.05$ . Specific statistical softwares, such as SPSS, were used in this study.

## RESULTS

The first 2 animals died in the anesthesia, after recalculation of drugs no one mouse died anymore. 2 animals had spontaneous extrusion of the grafts through the skin. In 1 animal the graft was not found. These animals were excluded.

The values of AP are shown in Table 1. The analysis indicate to a significant increase in AP expression respectively n the groups FDB + ST + VEGF, HA + ST and HA + ST + VEGF (P<0,001).

**Table 1 – AP RESULTS**

Box	Reconstruction	Tail color	AP (µmolS/min/ bone mg)
B 1	HA + SC	black	11,27
B 1	HA + SC + VEGF	green	20,50
B 1	HA + SC + VEGF	blue	33,10
Box	Reconstruction	Tail color	AP (µmolS/min/ bone mg)
B 2	FDB + SC + VEGF	blue	0,80
B 2	FDB + SC + VEGF	green	0,13
B 2	HA + SC + VEGF	black	9,32
B 2	HA + SC	red	3,03
B 2	HA + SC + VEGF	no color	15,47
B 3	FDB + SC + VEGF	black	1,25
B 3	HA + SC	blue	3,23
B 3	HA + SC	red	5,75
B 3	HA + SC	green	7,71
B 3	FDB + SC + VEGF	no color	2,36
B 4	HA + SC	no color	12,67
B 4	HA + SC	blue	9,12
B 4	HA + SC + VEGF	green	3,77
B 4	HA + SC + VEGF	red	5,95
B 4	HA + SC + VEGF	black	11,41
B 5	HA + SC	no color	13,26
B 5	FDB + SC + VEGF	blue	2,98
B 5	HA + SC + VEGF	green	5,78
B 5	HA + SC	red	8,28
B 5	FDB + SC + VEGF	black	1,47
B 6	FDB + SC + VEGF	blue	2,04
B 6	HA + SC	no color	5,57
B 6	HA + SC + VEGF	green	1,89
B 6	FDB + SC + VEGF	red	1,10
B 6	FDB + SC + VEGF	black	7,55

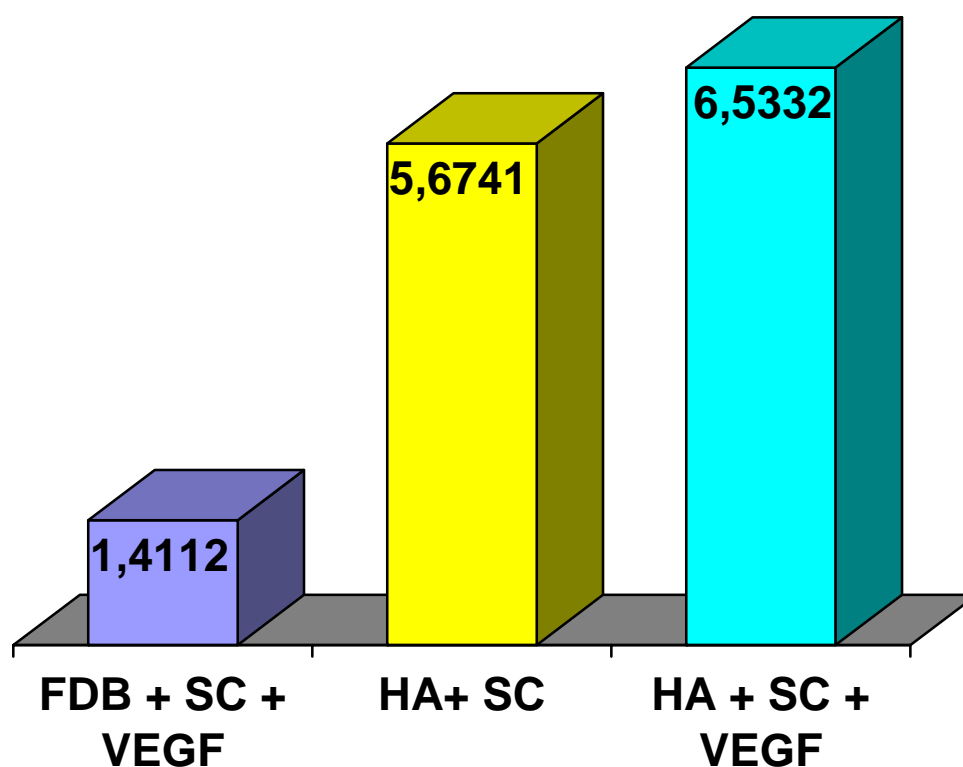
B 7	FDB + SC + VEGF	no color	1,41
B 7	HA + SC	blue	1,85
B 7	FDB + SC + VEGF	green	0,59
B 7	HA + SC	red	2,51
B 7	HA + SC + VEGF	black	5,79

B 8	HA + SC	No color	5,48
B 8	FDB + SC + VEGF	blue	1,45
B 8	FDB + SC + VEGF	green	0,64
B 8	HA + SC	red	3,65
B 8	HA + SC + VEGF	black	7,12

B 9	HA + SC + VEGF	blue	32,86
B 9	HA + SC + VEGF	green	1,97
B 9	HA + SC	red	5,67
B 9	HA + SC + VEGF	black	2,37

The medians of the AP results are shown in the Graphic 1:

**Graphic 1 – AP MEDIANS IN THE STUDY GROUPS**



Values of AP shown in  $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{bone mg}$

The AP medians and quartiles are shown in Table 2.

**Table 2 – MEDIANS, QUARTIL 25 (P25) E QUARTIL 75 (P75) OF AP IN THE STUDY GROUPS**

Study Group		AP ( $\mu\text{molS}/\text{min}/\text{bone mg}$ )
FDB + SC + VEGF	Median	1,4112
	P(25)	0,7155
	P(75)	2,2017
HA + SC	Median	5,6741
	P(25)	3,2261
	P(75)	9,1236
HA + SC + VEGF	Median	6,5332
	P(25)	3,4226
	P(75)	16,7256

The initial purpose of the research was to realize the histological analysis applying the histological scale of Ferreira (1997) excluding the criteria “cortical fusion” and “osteoclastic activity”.

Such scale has the following criteria:

6. New bone trabecules (0 to 3);
7. Osteoblastic activity (0 to 3);
8. Osteoclastic activity (absolute number in a 400-time amplification optic field);
9. Graft absorption (0 to 3);
10. Bone marrow viability (0 or 1).

On the specimens with HA this scale could not be applied. So the picrosirius color was performed. This analysis showed the presence of collagen, a granular tissue with prominent vessels and fibrilar deposition. This can be the beginning of bone formation.

## DISCUSSION

In this experiment, we have chosen C57BL/6 mice to keep developing the animal model created by the research line. Anterior researches had already determined the failure measuring 5mm x 3 mm was the critical failure to this animal. This is the smallest critical failure ever published (Portinho, 2006).

By shaping the grafts exactly the size of the cranial defect we tried to “prototype” the ideal reconstruction, fact that is fundamental to a cranial reconstruction (Youmans, 2003).

As we used two types of grafts matrix we developed a randomization method of the reconstruction and identification of the animals so that the surgeon could not know which type he would use in the surgery.

The AP was chosen as method of evaluation because studies in the literature prove this information (Sabokbar, 1994; Yoshikawa, 1990 and 2003; Stucki, 2001; Ge, 2004) and in this research line it has been used this technique.

The AP is an enzyme that can originate from several tissues from the organism. But with the technique used in this research we measure only the AP of the graft.

Due to size of the fragment it still was not developed another type of measurement like osteocalcin or osteopontin, that would increase the value of the research.

A bigger expression of AP in the group containing HA + SC + VEGF suggest one more intense metabolic activity that associated with the histological analysis make this reconstruction the more appropriated to the studied model.



One analysis in the same way it was purposed but with eight weeks of post operative seems to be the answer to this question. And it is what the researchers will do to publicate this research.

This model does not allow an evaluation of bone biomechanical resistance. This is a basic characteristic for a tissue whose main function is to protect central nervous system. Other animal models will be necessary for that.

Cell-matrix interaction has been studied, and It has been demonstrated that adhesion proteins are important to cell survival inside a matrix. Hanks and Atkinson (2004) showed that matrices with adhesion molecules expressions are capable of retaining a higher number of SC *in vitro*, when compared to FDB alone. Brodie et al. (2005) have demonstrated that covering HA matrices with collagen type I has increased cell proliferation, probably because of adhesion easiness.

Mesenchymal SC seem to have a higher biological potential. ET techniques which utilized SC combined to bone matrices, and assembled before implantation in receptor area, may be promising in reconstructive procedures in craniofacial skeleton.

## **CONCLUSION**

The activity of AP enzyme verified improves that bone reconstructions using HA with SC and VEGF show a high bone neoformation metabolism.

The comparison between different materials studied suggests that HA with SC and VEGF has a higher biological potential than FDB with SC and VEGF a than HA with SC.