

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

RECONSTRUÇÃO ÓSSEA DE CALOTA CRANIANA COM ENXERTOS
COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – ESTUDO
EXPERIMENTAL

CIRO PAZ PORTINHO, MD.

Porto Alegre, março de 2006.

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

**RECONSTRUÇÃO ÓSSEA DE CALOTA CRANIANA COM CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS – ESTUDO EXPERIMENTAL**

CIRO PAZ PORTINHO, MD.

**Dissertação submetida como requisito para
obtenção do título de MESTRE EM MEDICINA:
CIRURGIA.**

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares, MD, PhD.

Porto Alegre, março de 2006

P852r **Portinho, Ciro Paz**

Reconstrução óssea de calota craniana com células-tronco mesenquimais : estudo experimental / Ciro Paz Portinho ; orient. Marcus Vinícius Martins Collares. – 2006.

156 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Transplante de células-tronco mesenquimais 2. Cirurgia 3.

Crânio 4. Fraturas cranianas I. Collares, Marcus Vinícius Martins II.

Título.

NLM: QU 325

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

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 família**, pelos valores e fundamentos ensinados.

Ao **Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares**, pela sua orientação e crédito que me foram dados, mesmo antes de minha formação em Cirurgia Plástica e em Cirurgia Craniomaxilofacial; pelo modelo de talento, idealismo, iniciativa e perseverança que me inspirou a seguir o caminho desta desafiante área da cirurgia reparadora; pelas oportunidades que me foram criadas.

Ao **Prof. Dr. Rinaldo De Angeli Pinto**, pelos ensinamentos transmitidos com toda a sua experiência; por todas as oportunidades que me foram dadas, pela cordialidade e pela paciência.

À **Profa. Dra. Nance Beyer Nardi**, que norteou a construção deste projeto com sua personalidade e raciocínio brilhantes.

À **Profa. Dra. Carmen Pilla**, por toda a dedicação, competência e brilhantismo na estruturação das análises bioquímicas envolvidas 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.

À **Geneticista Flávia Helena Silva**, cujas idéias me fascinam e serviram de pilares para a montagem deste projeto envolvendo cirurgia plástica, engenharia de tecidos e cultivos celulares.

Ao **Geneticista Lindolfo Meirelles**, que auxiliou e enriqueceu com extrema competência o delineamento deste projeto.

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

Ao **Banco de Osso do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, cuja competência dos responsáveis originou matéria-prima de qualidade nacionalmente reconhecida, empregada neste estudo.

À **acadêmica de Biomedicina – FEEVALE Márcia Riboldi**, por todo o apoio e dedicação às análises laboratoriais que foram vitais para a conclusão deste projeto.

Aos **acadêmicos e doutorandos da FAMED-UFRGS**, pelo auxílio nos procedimentos e nas revisões: Régis Renosto, Evandro Siqueira, Karin Sumino, Gustavo Morellato, Diego Mendes, Lucas Santos e Karen da Rosa.

Aos **funcionários do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pela dedicação com que trataram os animais.

Aos **pós-graduandos e residentes** do Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA, pela oportunidade de descobrir bons amigos.

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

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

“Bone is fluid.”

Joseph G. McCarthy

“Todas as coisas são impermanentes,
todas as coisas são interdependentes”.

Sidarta Gautama

(560 a 480 a.C.)

Revisão Ortográfica da Língua Portuguesa e da Língua Inglesa:

Sra. Fernanda Morena da Silva

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Lista das Abreviaturas | 12 |
| Lista das Figuras | 14 |
| Lista das Tabelas | 17 |
| INTRODUÇÃO | 19 |
| 1. OBJETIVO | 30 |
| 1.1. Objetivo Geral | 30 |
| 1.2. Objetivo Secundário | 30 |
| 2. HIPÓTESE INFERENCIAL (H_1) | 31 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 32 |
| 4. MÉTODO | 53 |
| 4.1. Delineamento | 53 |
| 4.2. Locais de Realização | 53 |
| 4.3. População | 54 |
| 4.4. Grupos de Estudo | 54 |
| 4.5. Preparo dos Animais e Técnica Cirúrgica | 55 |

| | |
|---|-----|
| 4.6. Determinação do Modelo Experimental e da Falha Crítica | 57 |
| 4.7. Matriz Óssea | 59 |
| 4.8. Cultivo Celular de CT Mesenquimais Adultas de Camundongos Isogênicos C57BL/6 | 61 |
| 4.9. Análise das Amostras | 61 |
| 4.10. Análise Histológica | 62 |
| 4.11. Análise Bioquímica | 64 |
| 4.12. Análise Estatística | 64 |
| 4.13. Aspectos Bioéticos | 65 |
| 4.14. Financiamento | 66 |
| 5. RESULTADOS | 66 |
| 5.1. Análise Bioquímica | 67 |
| 5.2. Análise Histológica | 68 |
| 6. DISCUSSÃO | 69 |
| 7. CONCLUSÃO | 72 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| 9. FONTES CONSULTADAS | 83 |
| 10. ANEXO I – FIGURAS | 84 |
| 11. ANEXO II – TABELAS | 99 |
| 12. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – LÍNGUA PORTUGUESA | 108 |
| 13. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – LÍNGUA INGLESA | 131 |

LISTA DAS ABREVIATURAS

ABS: absorbância

AE: auto-enxerto

ANOVA: Análise de Variância, do inglês: *Analysis of Variance*

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

CT: células-tronco

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

DMAT: Departamento de Materiais

DP: desvio-padrão

ET: engenharia tecidual

EUA: Estados Unidos da América

FA: fosfatase alcalina

GPPG: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HA: hidroxiapatita

HE: hematoxilina-eosina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IC: intervalo de confiança

MEC: matriz extracelular

MNF: matriz neoformada

MO: medula óssea

Mrad: milirad(s)

MSO: materiais de substituição óssea

Nm: nanômetros

NS: não significativo

OC: osteoclastos.

OL: osso liofilizado

OL4: osso liofilizado com quatro semanas

OL8: osso liofilizado com oito semanas

PLA: ácido polilático

PLAGA: ácido polilático glicólico

PD: polpa dentária

RPM: rotações por minuto

P25: percentil 25

P75: percentil 75

SPO: semanas de pós-operatório

TC: tomografia computadorizada

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 – Rotas de diferenciação da CT adulta da medula óssea.

Figura 2 – Camundongo isogênico C57BL/6, adulto, fêmea, utilizado neste estudo.

Figura 3 – Esquema gráfico da técnica cirúrgica. A linha arciforme representa a incisão na pele sobre a calota craniana, entre as orelhas, iniciando na região occipital e estendendo-se até a região parietal direita, afastando-se ao máximo da região de craniotomia, impedindo que esta área fique em contato com a ferida operatória após o fechamento do escalpo. A área retangular representa a área de craniotomia parietal esquerda, medindo 3 x 5 mm aproximadamente, realizada com broca de perfuração n° 701 triangular (6 furos) e osteotomia com tesoura ou mesmo com broca de corte.

Figura 4 – Incisão do escalpo e dissecação do plano ósseo. Pode-se perceber os dois ossos parietais já expostos.

Figura 5 – Marcação da área de 5 x 3 mm para confecção da falha óssea, que receberá diferentes tipos de enxertos para sua reconstrução.

Figuras 6 e 7 – Imagem da craniotomia já realizada. Nota-se o fragmento inteiro, retirado na forma de um retângulo de 5 x 3 mm. A utilização de um descolador de periósteo delicado permitiu a manutenção da integridade meníngea na imensa maioria dos casos. A Figura 7 mostra a imagem ampliada.

Figura 8 – Câmara de CO₂ para sacrifício dos animais.

Figura 9 – Bloco de osso liofilizado – Banco de Osso – HCPA.

Figura 10 – Osso liofilizado fragmentado, após ter sido colocado em meio de cultivo celular contendo CT mesenquimais indiferenciadas.

Figura 11 – Placas de cultivo de CT mesenquimais – Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – UFRGS.

Figura 12 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 50x.

Figura 13 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 100x.

Figura 14 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 200x.

Figura 15 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 400x.

Figura 16 – Lâmina histológica de osso desmineralizado, corada com HE. Aumento de 400 vezes. Neste corte, há a presença de MO e de novas trabéculas.

Figura 17 – Lâmina histológica de osso desmineralizado, corada com HE. Aumento de 400 vezes. Observa-se neste corte um fragmento de OL não totalmente reabsorvido, com osteoclastos ao seu redor.

LISTA DAS TABELAS

TABELA 1 – DETALHAMENTO DA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA, SEGUNDO FERREIRA (1997).

TABELA 2 – VALORES DA FA ENCONTRADOS NOS ENXERTOS ÓSSEOS.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE FA ENTRE OS GRUPOS. OS VALORES FORAM SUBMETIDOS *RANKING* E, POSTERIORMENTE, AO TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE *POST HOC* DE BONFERRONI.

TABELA 4 – PREVALÊNCIA DE ATIVIDADE PRESENTE DA FA NAS AMOSTRAS AVALIADAS.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DA PONTUAÇÃO DA ESCALA HISTOLÓGICA ENTRE OS GRUPOS.

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA ENTRE OS GRUPOS. OS VALORES FORAM SUBMETIDOS A *RANKING* E, POSTERIORMENTE, AO TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE *POST HOC* DE BONFERRONI.

TABELA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO ABSOLUTO DE OSTEOCLASTOS ENTRE OS GRUPOS.

TABELA 8 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA CONTAGEM DE OSTEOCLASTOS. OS GRUPOS FORAM SUBMETIDOS A *RANKING* E, POSTERIORMENTE, AO TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE *POST HOC* DE BONFERRONI.

INTRODUÇÃO

As malformações congênitas e as perdas ósseas causadas por ressecções de tumores, infecções ou traumas são um desafio na cirurgia reparadora da face (Shang, 2001). Nesses procedimentos, a utilização de enxertos ósseos é freqüente. As áreas doadoras costumam ser: calota craniana bipartida, regiões da maxila e da mandíbula, costelas ou crista ilíaca (Ferreira, 1997; Silva, 2000; Conrad, 1993; Lemperle, 1998). 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).

No entanto, a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes ou após vários procedimentos cirúrgicos (Brodie, 2005; Lucarelli, 2004). Ainda, a cicatrização ósteo-cartilaginosa pode ser ineficiente em muitos casos (Issack, 2003).

Inúmeros estudos têm sido feitos no intuito de procurar materiais de substituição óssea (MSO) adequados. Nestas situações de extenso déficit ósseo, ou mesmo para diminuir o tempo e a morbidade cirúrgica, alternativas vêm sendo buscadas.

Os requisitos para um MSO ideal são (Sailer, 2000):

1. Estimular a regeneração e a consolidação óssea;
2. Proporcionar resistência fisiológica;
3. Permanecer observável (ter contraste radiográfico);
4. Ser obtido prontamente;
5. Ser fácil de usar;
6. Não causar reação inflamatória em tecidos adjacentes;
7. Não levar à encapsulação de tecido conjuntivo;
8. Não desencadear transformação maligna;
9. Não produzir subprodutos tóxicos;
10. Não ter propriedades galvânicas ou eletrolíticas;
11. Não proporcionar nenhum mecanismo facilitador de infecções.

Uma possibilidade atual é a utilização de material proveniente de bancos de tecidos. O uso de osso armazenado cresceu, nos Estados Unidos (EUA), de uma estimativa de 100.000 casos em 1971 para aproximadamente 250.000 em 1991 (Hardin, 1994; Ozaki, 1998). 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 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). 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; Yoshikawa, 2003).

O osso homólogo não é um tecido privilegiado imunologicamente, como já foi pensado. Ao contrário, tem se demonstrado a ocorrência de resposta imunológica mediada por células e reação antígeno-anticorpo ao enxerto. Os modelos animais indicam que a incorporação dos homoenxertos aumenta com a diminuição das diferenças de histocompatibilidade entre enxerto e receptor. Para o seu sucesso, por outro lado, é necessário manter os componentes orgânicos capazes de promover a osteoindução. Isso torna a escolha do processo de

armazenamento e de seleção do enxerto mais complexa e representa uma área de crescente pesquisa (Hardin, 1994).

A liofilização tem sido utilizada nos últimos 50 anos, tornando-se um dos métodos mais satisfatórios de preservação óssea (Angermann, 1991). 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 utilizados como implantes estruturais (Macedo, 1999; Conrad, 1993; Perry, 1999). Seus resultados, em modelos experimentais, têm sido inferiores ao osso autógeno (Cheng, 2005).

A tarefa de quem utiliza procedimentos de enxerto ósseo é escolher o enxerto correto para o meio biológico e mecânico onde este 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 (Hardin, 1994; Macedo, 1999).

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.

A ET envolve fundamentalmente duas etapas:

1. A manipulação *ex vivo* de células autógenas, sua expansão, diferenciação e introdução das mesmas em estruturas ordenadas superiores (ex.: 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, 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 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; Gronthos, 2001; 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, a 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, 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, pode-se lançar mão de linhagens já estabelecidas ou embriões não utilizados em clínicas de fertilização. Entretanto, isso enquadra a pesquisa em nível pré-clínico em nosso 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 das CT embrionárias e seus entraves. Foi demonstrado que o organismo adulto possui reservas de CT (Figura 1), e a fonte mais ampla 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*, esse 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. Assim, essas células costumam ser isoladas por sua tendência de aderir firmemente a placas de cultivo (Pereira, 1998; 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, a obtenção de condroblastos e osteoblastos a partir das tais células-satélites musculares ou de pré-adipócitos (Batouli, 2003; Gronthos, 2001). Essas observações 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 foi comprovado que osteoblastos bem diferenciados perdem suas propriedades fenotípicas e regenerativas durante períodos de cultivo, enquanto que células pouco diferenciadas do perióstio 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) (Carrington, 2005; Ge, 2004; Hanks, 2004; Meirelles, 2003; Muschler, 2002). A adição de fatores de crescimento e outras substâncias pode melhorar a regeneração e a integração de enxertos ósseos contendo ou não 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 a 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 também 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.

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).

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, diversos 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; Yoshikawa, 2003).

OBJETIVO

Objetivo Geral

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

Objetivo Secundário

Comparar enxertos contendo CT mesenquimais indiferenciadas do auto-enxerto (AE), que é o padrão-ouro de reconstrução.

Mensurar e comparar a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) na reconstrução com CT, apenas com uma matriz óssea (OL) e no AE.

HIPÓTESE INFERENCIAL OU DE PESQUISA (H_1)

Há diferença na regeneração óssea de falhas de calota craniana quando se utiliza CT mesenquimais.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O procedimento que primeiro incluiu um enxerto ósseo heterólogo (de um cão) foi descrito em 1668 por Van Meekeren (Andersen, 1995). Macewen (Perry, 1999), em 1880, foi pioneiro ao descrever o uso do homoenxerto como forma de reconstituir o tecido ósseo. Nesse 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 perióstio (Volpon, 2000).

Os conceitos básicos da cicatrização e integração óssea foram formulados, ainda no final do século XIX, por Barth. Em teoria, mostrou que a remoção do osso necrosado ocorreria simultaneamente ao depósito do novo osso. Este processo, foi demonstrado indiretamente em exames histopatológicos em espécimes mortos (Albrektsson, 1980).

Sailer e Pajarola (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. O procedimento regenerativo na mandíbula pode ser ligeiramente mais longo do que na maxila.

Delacure (1994) publicou uma revisão sobre os mecanismos fisiológicos da cicatrização óssea. Ele cita que a compreensão desses processos permite escolher as melhores 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 25 coelhos Nova Zelândia. 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 16 semanas. A análise de volume por tomografia computadorizada (TC) demonstrou uma reabsorção significativamente maior no osso medular endocondral do que no cortical, fosse membranoso, fosse endocondral ($P < 0,05$). Isso ocorreu nos três tempos de avaliação. Entre esses dois últimos, não houve diferença

significativa. Assim, os autores acreditam que o osso cortical possa 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. Este trabalho também foi realizado em coelhos Nova Zelândia, divididos em dois grupos e sacrificados após o mesmo período: três, oito e 16 semanas. 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 16 semanas. Esses 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 auto-enxertos medulares em falhas de calota craniana e mandíbula em cães. Após dois e quatro meses, 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, porque podem ser consideradas variáveis fundamentais na osteogênese.

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

Carrington (2005) revisou o envelhecimento tecidual do osso e da cartilagem. Citou que esse fator é um risco importante para doenças degenerativas, como a osteoartrose e a osteoporose. As alterações que ocorrem com o envelhecimento ainda não estão bem elucidadas. As células-tronco (CT) podem ter um papel em todo esse processo, mas seus estímulos e mecanismos de ação devem ser bem compreendidos.

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, e o potencial osteoindutivo foi baixo.

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

Deluca e cols. (1997) observaram a perda de volume em enxertos ósseos autólogos. 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. Concluiu-se 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*.

Hardin (1994) apresentou uma revisão sobre o armazenamento ósseo. Há muitas formas disponíveis: fresco, congelado, liofilizado e desmineralizado. Cada um tem vantagens e desvantagens – cabe ao cirurgião estudar e familiarizar-se com cada forma. Estima-se que, no futuro, os enxertos homogêneos tornem-se obsoletos. Cita-se que uma das soluções poderia ser a fabricação de osso sintético com o auxílio de Proteína Morfogênica Óssea (BMP).

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 autógeno 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 das 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 (2002) comparou 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.

Angermann e Jepsen (1991) publicaram diretrizes para armazenamento e descontaminação de homoenxertos ósseos e de colágeno. Eles comprovaram que nem o congelamento, nem a liofilização resultam na descontaminação segura do osso, principalmente em relação a agentes virais. Os métodos químicos e a irradiação, por outro lado, foram considerados potencialmente danosos à qualidade do osso.

No entanto, 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, fossem singênicos, fossem homólogos. Após seis meses, a resistência dos dois enxertos foi similar. Assim, nesse 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.

Devecioglu e cols. (2004) analisaram o efeito de diferentes biomateriais em cirurgias periodontais. O grupo com OL apresentou a maior quantidade de formação de nódulos de aspecto mineral em relação a outros materiais, a saber: osso congelado; HA de corais e cimento de fosfato de cálcio.

Nakahara e cols. (1990) examinaram células do periósteo de frangos. Demonstrou-se 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, iniciou-se uma gama de 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.

Machens e Mainlander (2005) publicaram uma revisão envolvendo medicina regenerativa e cirurgia plástica. Houve evolução na biologia celular – com destaque para as CT –, na nanotecnologia, na farmacologia e na bioengenharia.

A medicina regenerativa busca novas formas terapêuticas para promover e dar suporte aos potenciais regenerativos autógenos dos sistemas biológicos humanos. A cirurgia plástica tem muito interesse na medicina regenerativa devido ao enfoque reparador.

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 há 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 apresentam 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, 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 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⁻). 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.

Sonoyama e cols. (2005) revisaram o papel das CT na medicina regenerativa e salientam que pode haver um papel promissor nas terapias relacionadas à osteogênese.

Jones e Trainor (2004) analisaram a utilização potencial das CT em anomalias craniofaciais. Terapias que utilizem essas células poderiam induzir à geração de novas populações de células da crista neural e tecidos e órgãos derivados.

Um estudo utilizou CT mesenquimais de oito ovelhas para reparo craniano de defeitos ósseos (Shang, 2001). Foram criados defeitos bilaterais de 20 mm 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.

Zvaifler e cols. (2000) estudaram CT mesenquimais presentes no sangue de indivíduos hígidos. A adição de suplementos osteogênicos à

cultura – dexametasona, ácido ascórbico e beta-glicerolfosfato – inibiu a formação de fibroblastos, e as CT assumiram uma forma cubóide similar a osteoblastos. Após cinco dias nessa cultura, foi possível mensurar níveis de FA, que dobraram com o acréscimo de BMP-2.

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.

Pereira e cols. (1998) examinaram a regeneração óssea em um modelo experimental de osteogênese imperfeita. CT mesenquimais da MO foram injetadas em camundongos isogênicos com essa doença. Através da marcação do cromossomo Y das células do doador colocadas em fêmeas, detectou-se até 19% do total de fibroblastos ou de células semelhantes ao fibroblastos em diversos tecidos, inclusive o osso. Nos animais que receberam a infusão de CT, houve um crescimento pequeno, porém significativo do colágeno e do conteúdo mineral ósseo.

Yoshikawa e Ohgushi (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 hematopoiéticas também foram encontradas.

Ueda e cols. (2005) utilizaram CT em seis pacientes (20 implantes ósseos), para reconstruções alveolares. Eles relatam um crescimento na altura da crista óssea alveolar. O material utilizado consistia em CT mesenquimais, plasma rico em plaquetas e fosfato de beta-tricálcio.

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 $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$ 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.

Brodie e cols. (2005) estudaram a proliferação celular de osteoblastos de ratos após a colocação de colágeno tipo I em matrizes de HA e fosfato de cálcio. Eles registraram aumento dessa proliferação quando há a cobertura de colágeno. A avaliação foi feita por fluorescência com carboxifluoresceína.

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.

Issack e Di Cesare (2003) examinaram o efeito das BMP em reparos ósseos e cartilagosos. Tais proteínas têm a capacidade de induzir a formação, até mesmo ectópica, de osso e cartilagem *in vivo*. Trabalhos em animais têm demonstrado que as BMP aumentam fusões espinhais, aceleram uniões ósseas e otimizam cicatrizações cartilagosas.

Riley e cols. (1996) revisaram 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 5×10^7 /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, 2002). 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 subsequente transformará-se 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 subsequente 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 ilíaca 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.

MÉTODO

Delineamento

Estudo experimental, aberto, comparado e prospectivo.

Locais de Realização

Este estudo foi realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Participaram desse projeto: a Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial – Serviço de Cirurgia Plástica – HCPA, o Banco de Ossos – Serviço de Ortopedia e Traumatologia – HCPA, 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.

População

Foram utilizados camundongos adultos, fêmeas, da linhagem isogênica C57BL/6, com dois meses de vida e peso entre 50 e 100 g (Figura 2). A escolha por fêmeas partiu 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, como já descrito por Pereira e cols. (1998).

Grupos de Estudo

Os grupos de estudo foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo 1:** Calota craniana retirada durante a criação da falha óssea (craniotomia). Esse grupo serviu de mensuração dos valores basais de FA na região receptora.
- **Grupo 2:** OL com quatro semanas (OL4).
- **Grupo 3:** OL com oito semanas (OL8).

- **Grupo 4:** CT mesenquimais indiferenciadas e OL (CT+OL)
- **Grupo 5:** AE ortotópico de calota craniana. Nesse grupo, a falha foi criada e o fragmento ósseo foi desvascularizado e recolocado na própria falha. Este procedimento permitiu avaliar a reconstrução padrão-ouro.

Preparo dos Animais e Técnica Cirúrgica

Os pesquisadores seguiram todas as normas de bioética e a legislação vigente sobre experimentos com animais. Todos os procedimentos cirúrgicos, inclusive a retirada dos enxertos ósseos, realizaram-se sob cuidados estritos de anti-sepsia.

Aplicou-se solução de iodoform aquoso em toda a cabeça do animal para a anti-sepsia, isolando a região operatória com campos estéreis. A anestesia foi realizada com quetamina (10 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e xilazina (5 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). 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 analgesia foi realizada com tramadol (1 mg/kg, intramuscular, 8/8 horas, duas doses; fornecido por Carlo Erba S. A., Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Foram criadas falhas ósseas (com uso de broca cirúrgica, odontológica, de perfuração, n°. 701) 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. Para evitar dano térmico às margens da falha óssea, foram feitos seis furos com essa broca, e o osso foi cortado com uma tesoura de Íris (Figuras 3 a 7). A seguir, um descolador de periósteo delicado foi empregado para abrir a falha, minimizando lacerações meníngeas.

Através de um estudo-piloto, demonstrou-se que uma falha de 3 x 5 mm pode ser utilizada, sem que haja o viés da regeneração total espontânea da falha. A falha óssea de 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 ou oito semanas de pós-operatório em câmara de CO₂ (Biotécnicas, São Paulo, SP) (Figura 8), conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa – HCPA. Escolhemos esses períodos porque já foi demonstrado que a osteogênese de enxertos inicia-se entre duas e quatro semanas (Batouli, 2003). O OL foi estudado também com oito semanas, a fim de avaliar a progressão dessa matriz sem a utilização das CT mesenquimais.

Determinação do Modelo Experimental e da Falha Crítica

Utilizamos grupos-piloto para determinar a falha crítica. Conforme já discutido na literatura (Oliveira, 2002; Yoshikawa, 1999), criamos falhas retangulares.

1- Em um grupo, fizemos uma falha óssea biparietal, que atravessava a sutura sagital. Foram utilizados 10 animais. Em todos, houve laceração em maior ou menor grau do seio sagital superior, tendo o sangramento sido contido com Surgicel®. A falha criada era de 10 x 5 mm. Embora não tenha havido perdas no transoperatório, e a despeito da antibioticoprofilaxia utilizada no pós-operatório (tetraciclina por via oral), nove dos dez animais morreram nos primeiros 10 dias de pós-operatório. Assim, não foi possível estudar ossificação pelo período de pelo menos quatro semanas nesse grupo. As críticas levantadas foram as seguintes:

2- A falha óssea criada era muito extensa, acarretando grande morbimortalidade.

3- A falha expunha o seio sagital, colocando o animal em risco de sangramento e de infecções graves do sistema nervoso central.

4- A sutura do escalpo ficava justamente em cima do seio sagital, o que determinaria, pelo menos nos primeiros dias de pós-operatório, solução de continuidade entre o meio-ambiente e o sistema nervoso central.

Assim, decidimos colocar de lado este modelo e estudar um menos invasivo.

No modelo seguinte, confeccionamos uma falha óssea apenas no osso parietal esquerdo, de 3 x 5 mm, com maior extensão no plano sagital. Utilizamos 10 animais, sendo que todos sobreviveram ao período de oito semanas. Em nenhum deles houve fechamento espontâneo da falha óssea criada pelos pesquisadores, nem mesmo atingindo 50% da área dessa falha. Ao refazer a abordagem cirúrgica, não havia em nenhum dos animais nem sinais flogísticos macroscópicos, nem exposição da área operada. Dessa forma, consideramos o modelo adequado para a avaliação de regeneração óssea. Esse modelo de falha permitia que a incisão do escalpo ficasse afastada da área de manipulação óssea, provocando sangramento menor por não haver risco de lesão do seio sagital e também pela menor área de manipulação óssea envolvida.

As críticas que poderiam ser feitas a esse segundo modelo (e também ao primeiro) são de que ele pode não ser adequado para testes de resistência óssea, em função da espessura óssea da calota craniana dos camundongos C57BL/6.

Nós escolhemos estes animais porque:

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).

Matriz Óssea

O OL tem sido utilizado em larga escala em procedimentos cirúrgicos da 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 (Figura 9). 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 é o seguinte:

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 (-40°C) durante sete dias;
10. Empacotamento em embalagens permeáveis a gás;
11. Esterilização em autoclave por 10 minutos a 121°C.

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.

Cultivo Celular de CT Mesenquimais Adultas de Camundongos

Isogênicos C57BL/6

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

As células foram isoladas a partir de um aspirado de MO (Figura 10 e 11). Os cultivos celulares utilizados foram de baixa densidade, para isolar as CT mesenquimais (Figuras 12 a 15). O isolamento e a preparação das culturas celulares previamente à colocação da matriz óssea seguiu o protocolo de Meirelles e Nardi (2003). A concentração celular em cada amostra foi de aproximadamente 5×10^5 células/ml.

O crescimento das colônias foi realizado sem adição de fatores de crescimento, conforme já descrito por outro autor (Zvaifler e cols., 2000). Para a separação das CT mesenquimais a partir do aspirado de medula óssea, utilizou-se as propriedades biológicas das CT mesenquimais e as do meio de cultura empregado (aderência x sobrenadante).

Análise das Amostras

Foram feitas avaliações histológicas e bioquímicas de cada cultura. Os resultados foram comparados descritiva e analiticamente entre os

grupos. Tais avaliações foram feitas de amostras retiradas na quarta semana. Um grupo de OL foi analisado com oito semanas, com o intuito de comparar o comportamento isolado da matriz em questão.

Os animais foram sacrificados (conforme protocolo do Centro de Pesquisas – ver abaixo) após quatro ou oito semanas de pós-operatório. Estudos prévios demonstraram cicatrização óssea significativa a partir de quatro semanas (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 deste fragmento ósseo foi colocado em formalina e levado à preparação histológica com hematoxilina-eosina (HE). Uma escala histológica, descrita por Ferreira (1997) e utilizada por Oliveira (2002) foi aplicada. A outra metade foi colocada em soro fisiológico e transportada imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica – CP – HCPA, para análise da FA.

Análise Histológica

Após quatro ou oito semanas da cirurgia, retiramos o enxerto e colocamos metade do mesmo em formalina, para histologia, e metade em soro fisiológico, para aferição bioquímica.

As lâminas histológicas foram 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”.

Foi escolhida para análise histológica 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).

Essa 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 1.

Análise Bioquímica

A atividade da FA foi expressa como unidade por miligrama de osso do enxerto. A determinação da atividade FA óssea foi padronizada conforme Yoshikawa e Ohgushi(1999). A enzima foi extraída do osso com auxílio de Triton 0,2 %; a atividade foi ensaiada utilizando como substrato o p-nitrofenilfosfato (Kit de diagnóstico Sera-Pak Bayer®, São Paulo, Brasil). Para a escolha do melhor sistema de incubação a ser utilizado na determinação da atividade da FA, foram realizadas curvas de tempo e concentração. O estudo desta curva permitiu a redução do tempo de incubação, preconizado pelo fabricante, de 30 minutos para cinco minutos; além disso, encontrou-se a diluição adequada para os nossos ensaios. O cálculo da FA foi determinado pela seguinte fórmula:

$$[\text{fator} \times (\Delta \text{ABS}) \times 100] / \text{massa da amostra} = \text{U/min/mg de osso}$$

Análise Estatística

A análise estatística foi feita da seguinte forma:

– Variáveis contínuas e paramétricas: Teste de ANOVA, com análise posterior pelo Teste de Bonferroni.

- Variáveis contínuas e não-paramétricas: *Ranking* e teste de ANOVA, com análise posterior pelo Teste de Bonferroni.
- Variáveis categóricas: Teste do χ^2 (qui-quadrado).

Uma diferença estatística foi considerada significativa sempre que o P for menor que 0,05 e o intervalo de confiança não ultrapassar 1,00. A análise estatística foi realizada com o auxílio de *softwares* específicos, como o SPSS for Windows versão 12.0.

As variáveis paramétricas foram apresentadas com a média e o desvio padrão (DP). Já as variáveis não-paramétricas foram apresentadas também com a mediana e os percentis 25 (P25) e 75 (P75).

As análises estatísticas foram revisadas com os profissionais de estatística do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA.

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 CO₂ 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.

Este trabalho seguiu as normas bioéticas estabelecidas pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – HCPA, da Unidade de Experimentação Animal – CP – HCPA e do *National Institutes of Health (NIRC)*.

Financiamento

1. CNPq – Edital Universal – Processo n°479432/03-1 – Valor: R\$ 15.709,55.
2. FIPE/HCPA – Processo GPPG n°03143 – Valor: R\$ 3.917,00.

RESULTADOS

Análise Bioquímica

Os valores encontrados estão dispostos na Tabela 2. Dentro das análises realizadas (Tabela 3), foram encontradas diferenças significativas entre OL4 e células-tronco com matriz de osso liofilizado (CT+OL) ($P=0,0001$), bem como entre OL8 e CT+OL ($P=0,0014$) (*ranking* e teste ANOVA, com análise *post hoc* de Bonferroni).

A prevalência da atividade presente da enzima FA nas amostras avaliadas também foi considerada entre os grupos (Tabela 4). O grupo com maior atividade enzimática foi o CT+OL (86,2%), e o menor o OL4 (46,7%). Foi realizado o teste do Qui-Quadrado de Pearson para análises múltiplas, que demonstrou diferenças significativas entre os grupos (Qui-Quadrado = 11,29; $P=0,024$). O Grupo CT+OL teve o maior resíduo ajustado, 2,4.

Análise Histológica

Foi realizada conforme a escala histológica de Ferreira (1997), excluindo-se os critérios “fusão de corticais” e “atividade osteoclástica”. Esta última foi analisada separadamente. Os resultados estão descritos na Tabela 5.

As Figuras 16 e 17 evidenciam alguns critérios histológicos avaliados. Houve diferença estatística significativa entre OL4 e OL8 semanas ($P=0,010$), entre OL4 e CT+OL ($P=0,001$) e entre OL4 e AE ($P=0,001$), conforme consta na Tabela 6. Para estas análises estatísticas, os valores foram submetidos a *ranking* e, após, foi utilizado o Teste de ANOVA, com análise *post hoc* de Bonferroni.

A atividade osteoclástica foi analisada em separado. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. A contagem destas células foi maior nos grupos de OL4 e OL8, ou seja, grupos sem células dentro do enxerto. Conforme demonstrado na Tabela 8, foram encontradas diferenças significativas entre OL4 e OL8 ($P=0,034$) e entre OL8 e AE ($P=0,003$). Como a análise anterior, os valores foram submetidos a uma transformação por *ranking* e, após, foi utilizado o Teste de ANOVA, com análise *post hoc* de Bonferroni.

DISCUSSÃO

Neste experimento, optou-se pelo uso de camundongos C57BL/6 pela facilidade de utilizar culturas e animais isogênicos. Foram utilizados animais adultos porque a regeneração é menor e porque há maior absorção óssea em imaturos (Delacure, 1994; Riley, 1996). Optou-se por fêmeas pela possibilidade futura de marcar o cromossomo Y, já que todas as culturas celulares do Laboratório de Imunogenética foram realizadas com células de machos.

Houve regeneração em todos os grupos estudados. No entanto, diferenças marcantes foram encontradas, do ponto de vista de nossas aferições bioquímicas e histológicas. A inclusão de CT em áreas reconstruídas melhorou significativamente a reconstrução óssea, a ponto de o grupo com CT+OL ter resultados equivalentes à reconstrução com AE, o padrão-ouro.

A diferença da FA em quatro semanas reflete uma atividade metabólica maior no grupo com CT. Esta diferença é reforçada pela

prevalência das amostras com atividade enzimática presente, que foi significativamente maior no grupo CT+OL. A interação entre CT e OL demonstrou superioridade em relação aos outros grupos de reconstrução não autógena.

Os resultados da reconstrução com OL isolado, após quatro semanas, foram inferiores aos grupos em que as CT foram associadas. Após oito semanas, os padrões bioquímicos e histológicos apresentaram melhoria, mas isso denota a lentidão do processo regenerativo quando uma matriz acelular é utilizada. O período de quatro semanas parece ser adequado para o estudo de regeneração óssea e está de acordo com os estudos de Brodie e cols. (2005), Batouli e cols. (2004), Lohmann e cols. (2001) e Schwartz e cols. (1996). Batouli e cols. (2004) demonstraram que a osteogênese já pode ser percebida a partir de duas semanas.

A FA é uma enzima que pode se originar de vários tecidos do organismo. No entanto, desenvolvemos um método de aferição de sua concentração apenas no enxerto realizado, de forma que outras fontes não influíssem nos valores calculados. Essa análise, no entanto, forçou-nos a descartar um critério histológico importante, que é a fusão de corticais. Para que tal análise fosse feita, seria necessário retirar o osso autógeno da margem da falha criada no osso parietal do camundongo. Isso poderia distorcer os níveis de FA, invalidando as aferições enzimáticas. Como o critério de fusão é importante, sem dúvida, um trabalho futuro deverá ser projetado para permitir sua avaliação.

A atividade osteoclástica foi maior em todos os grupos em que houve reconstrução com OL. O grupo padrão-ouro, após quatro semanas, demonstrou um número bastante reduzido dessas células. É interessante notar que o grupo com CT teve atividade menor, embora não significativa, do que o grupo OL4.

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

Este modelo não admite avaliar a resistência biomecânica do osso. Esta característica é fundamental para um tecido que serve principalmente para proteção na região da cabeça. Serão necessários modelos de animais maiores, onde estudos biomecânicos apropriados poderão ser empregados.

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.

CONCLUSÃO

A reconstrução óssea experimental de calota craniana, com emprego de CT mesenquimais, apresenta resultados favoráveis do ponto de vista bioquímico e histológico. O acréscimo dessas células evidenciou resultados similares ao osso autógeno e significativamente superiores à matriz de OL isolada – após um período de quatro semanas.

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

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.

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. Angermann P, Jepsen OB. Procurement, banking and decontamination of bone and collagenous tissue allografts: guidelines for infection control. *J Hosp Infect* 1991;17:159-69.
4. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am* 1995;33(2):391-400.
5. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Gehron-Robey P, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82(12):976-81.

6. 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.
7. Carrington JL. Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;18:328(3):700-8.
8. 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.
9. 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. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 1993;290:279-84.
11. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 2005;124(2):201-8.
12. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27:859-74.
13. Deluca L, Raszewski R, Tresser N, Guyuron B. The fate of preserved autogenous bone graft. *Plast Reconstr Surg* 1997;99(5):1325-8.
14. Devecioglu D, Tozum TF, Sengun D, Nohutcu RM. Biomaterials in periodontal regenerative surgery: effects of cryopreserved bone, commercially available coral, demineralized freeze-dried dentin, and

cementum on periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *J Biomater Appl* 2004;19(2):107-20.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. *Int J Mol Med* 2005;15(6):899-905.
21. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189(1):54-63.
22. 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.
23. Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27(5):911-25.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

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. Bone 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. Machens HG, Mainlander P. Regenerative Medizin und Plastische Chirurgie. *Chirurg* 2005;76(5):474-80.

34. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123(4):702-11.
35. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med* 2001;226(6):507-20.
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. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.

42. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:498-502.

43. 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.

44. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999;360:71-86.

45. 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.

46. 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.

47. 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.

48. Sailer HF, Pajarola GF. *Cirurgia Bucal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000. Pp. 213-20.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Silva, FH. Produção de vetores lentivirais baseados em HIV-1 em linhagem de célula tronco mesenquimal murina. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS PPGGBM/UFRGS. Março de 2005.
53. Sonoyama W, Coppe C, Gronthos S, Shi S. Skeletal stem cells in regenerative medicine. *Curr Top Dev Biol* 2005;67:305-23.
54. Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Rel Res* 1996;324:66-74.
55. 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.

56. Sylvester, KG, Longaker, MT. Stem Cells: Review and Update. Arch Surg 2004;139:93-99.
57. 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.
58. Volpon JB, Costa RMP. Ensaio mecânico e uso clínico do enxerto homogêneo processado. Rev Bras Ortop 2000;35(6):219-24.
59. 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.
60. Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft--bone reconstruction using tissue engineering approach. J Ann Chir Gynaecol 1999; 88(3): 186-92.
61. 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.
62. Zasacki, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. Clin Orthop Rel Res 1991; 272: 82-7.

63. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2:477-88.

FONTES CONSULTADAS

1. Brasil, Ministério da Ciência e Tecnologia, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio. Instrução Normativa 08/97. Diário Oficial da União, 31/07/97.
2. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIRC). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
3. Site do Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul:
<http://www.ufrgs.br/imunogenetica/pesquisas.htm>

ANEXO I – FIGURAS

FIGURA 1 – Rotas de diferenciação da CT adulta da medula óssea.

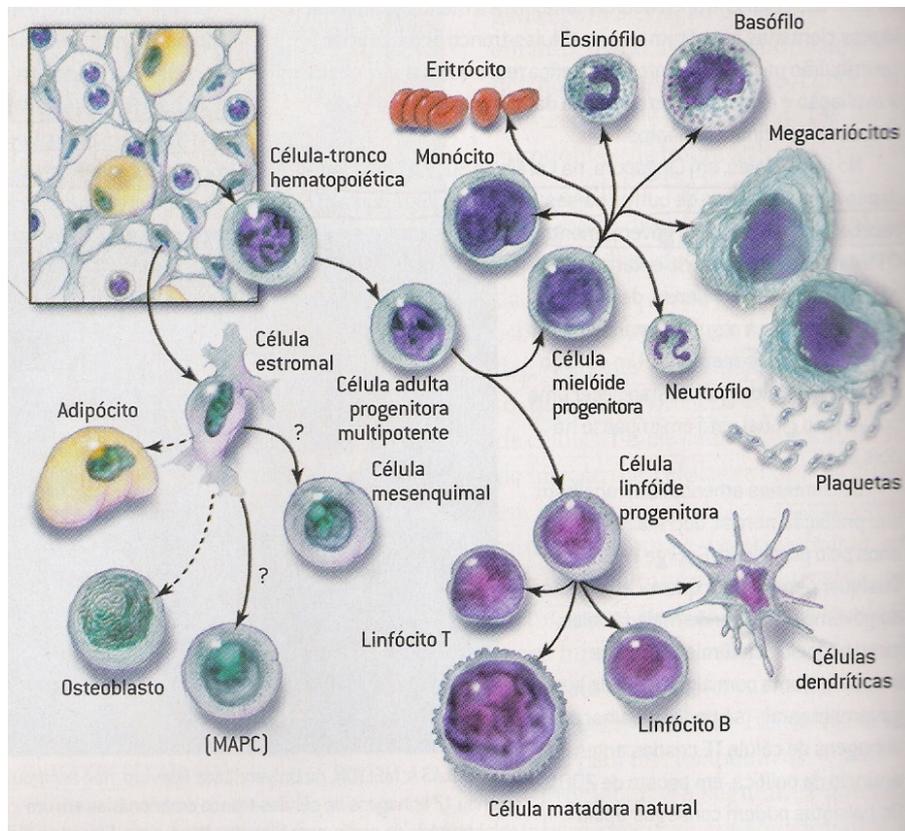


FIGURA 2 – Camundongo isogênico C57BL/6, adulto, fêmea, utilizado neste estudo.



FIGURA 3 – Esquema gráfico da técnica cirúrgica. A linha arciforme representa a incisão na pele sobre a calota craniana, entre as orelhas, iniciando na região occipital e estendendo-se até a região parietal direita, afastando-se ao máximo da região de craniotomia, impedindo que esta área fique em contato com a ferida operatória após o fechamento do escalpo. A área retangular representa a área de craniotomia parietal esquerda, medindo 3 x 5 mm aproximadamente, realizada com broca de perfuração (6 furos) e osteotomia com tesoura ou mesmo com broca de corte.

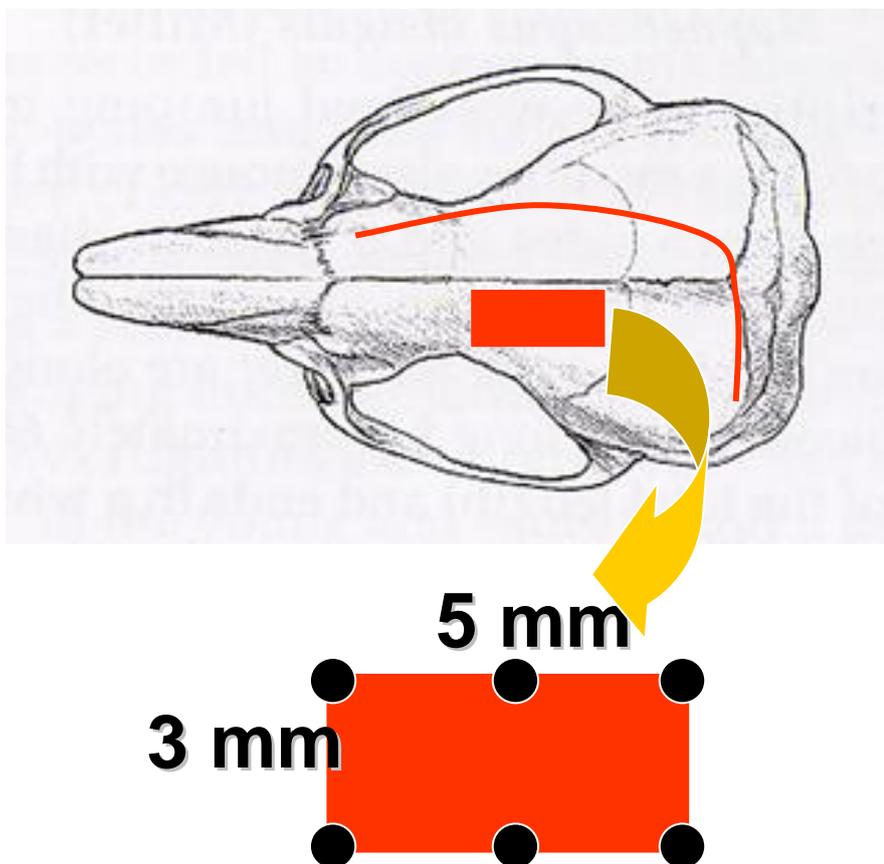
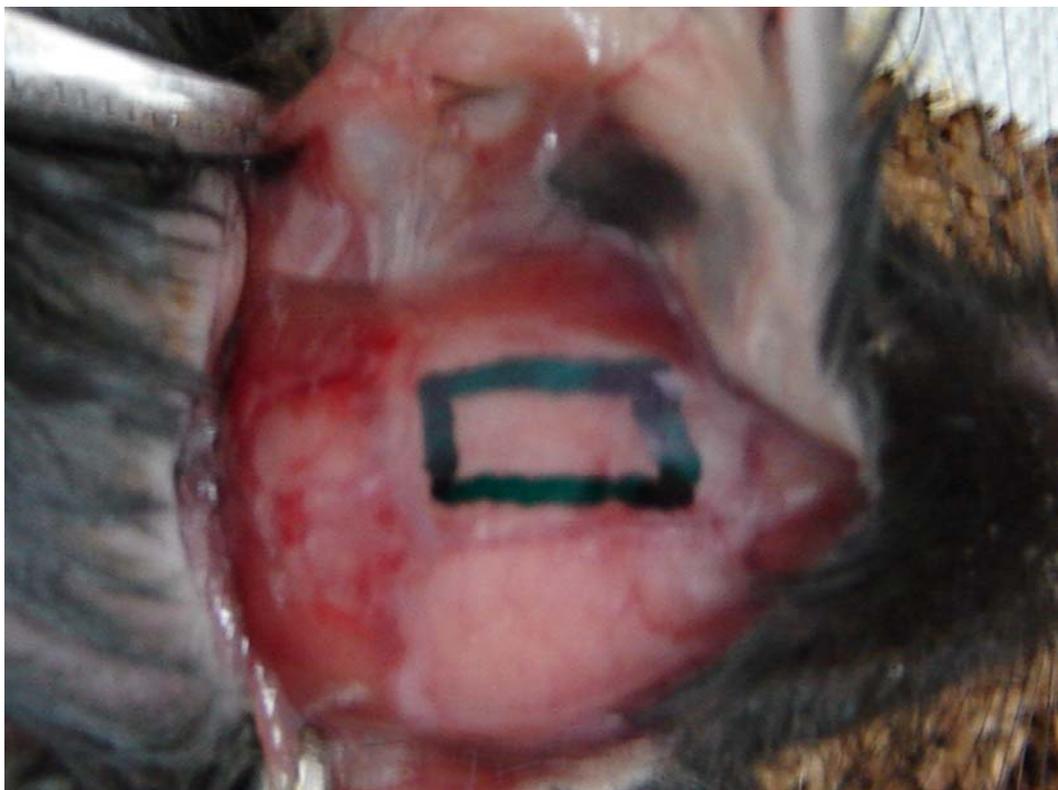


FIGURA 4 – Incisão do escalpo e dissecação do plano ósseo. Pode-se perceber os dois ossos parietais já expostos.



FIGURA 5 – Marcação da área de 5 x 3 mm para confecção da falha óssea, que receberá diferentes tipos de enxertos para sua reconstrução.



FIGURAS 6 E 7 – Imagem da craniotomia já realizada. Note-se o fragmento inteiro, retirado na forma de um retângulo de 5 x 3 mm. A utilização de um descolador de periósteo delicado permitiu a manutenção da integridade meníngea na imensa maioria dos casos.

figura 7 mostra a imagem ampliada.



FIGURA 8 – Câmara de CO₂ para sacrifício dos animais.



FIGURA 9 – Bloco de osso liofilizado – Banco de Osso do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



FIGURA 10 – Osso liofilizado fragmentado, após ter sido colocado em meio de cultivo celular contendo células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

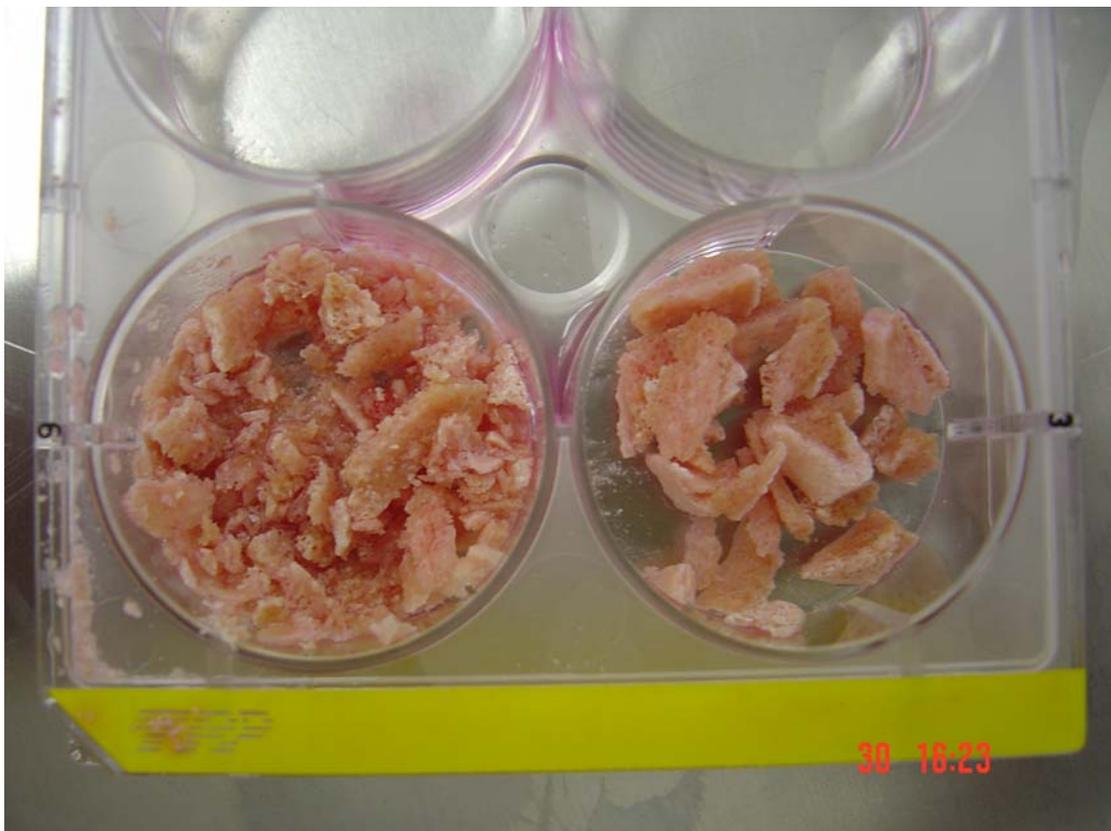


FIGURA 11 – Placas de cultivo de CT mesenquimais – Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

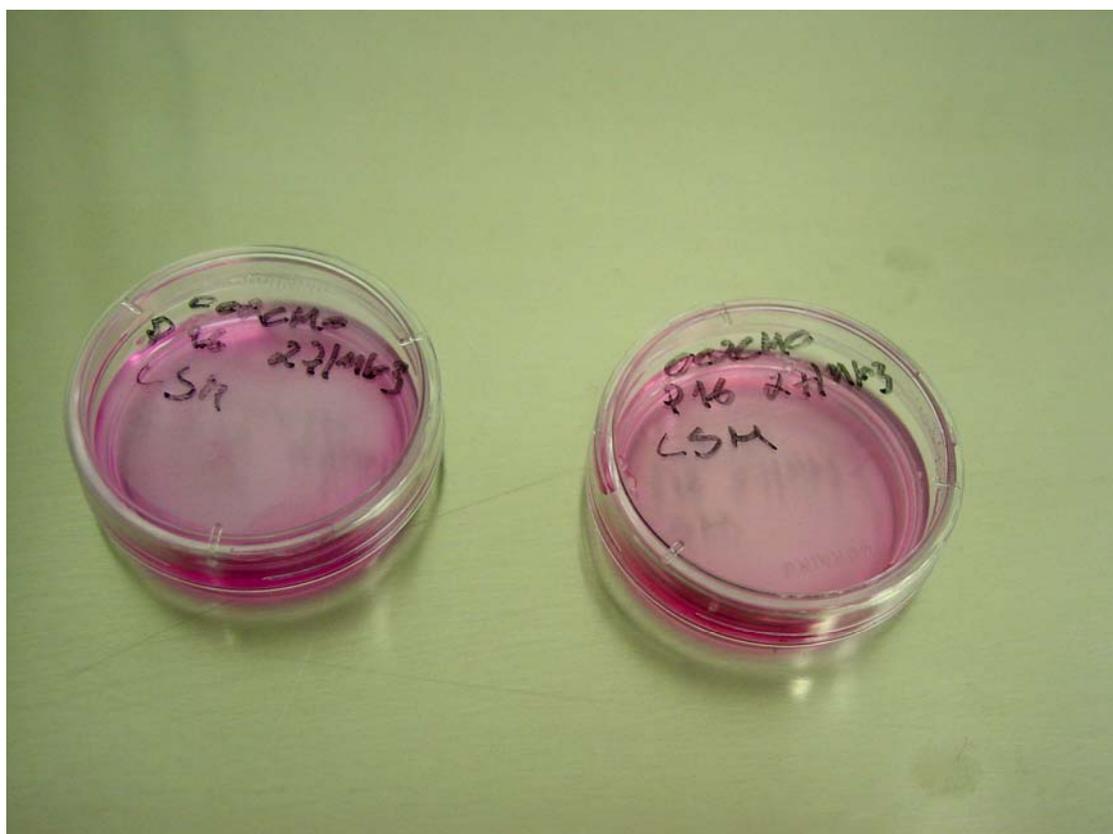


FIGURA 12 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 50x.

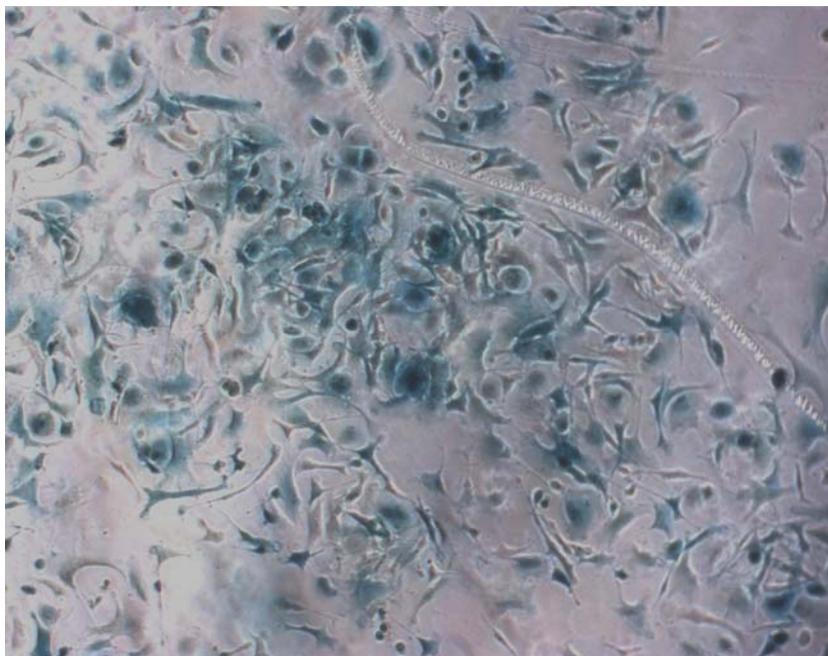


FIGURA 13 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 100x.

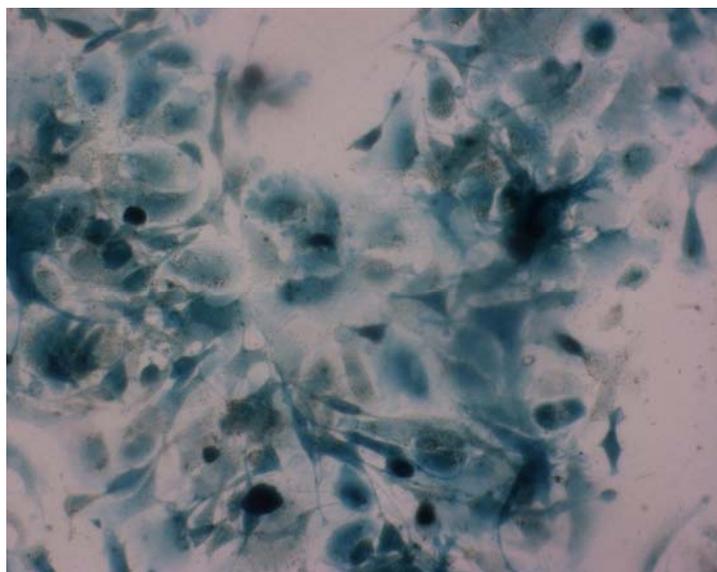


FIGURA 14 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 200x.

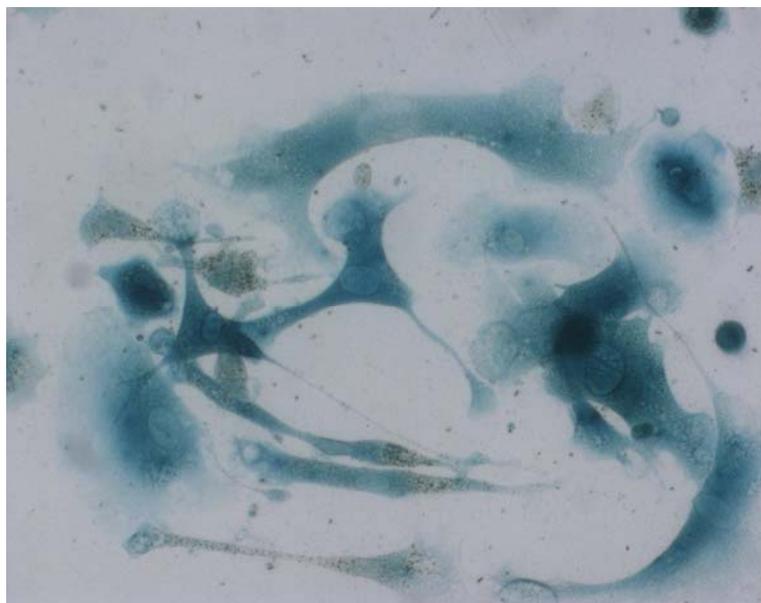


FIGURA 15 – Cultivo de CT mesenquimais murinas. Ampliação: 400x.

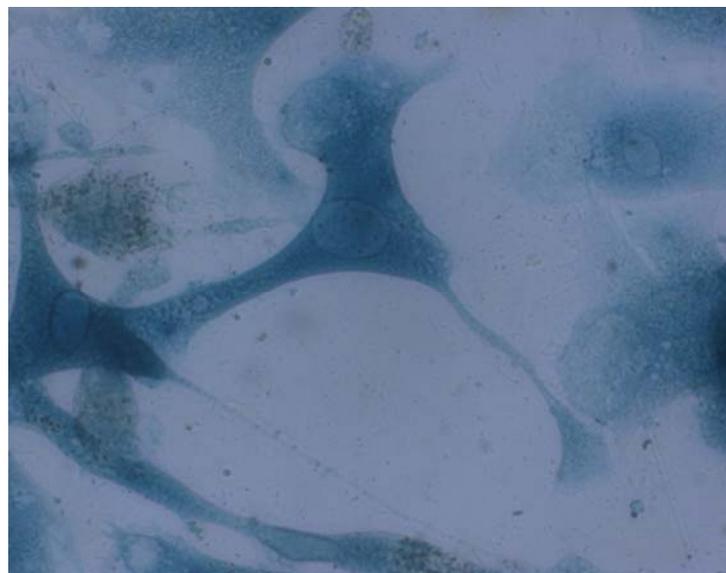
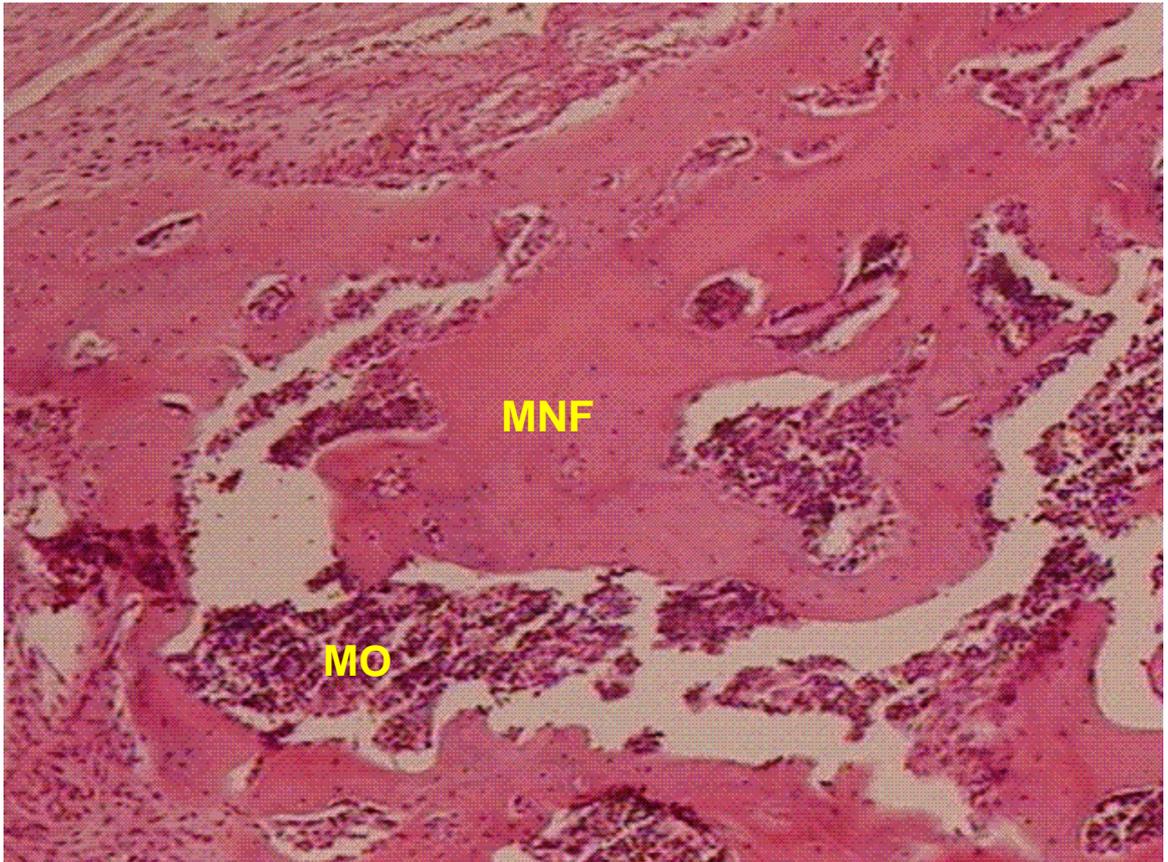


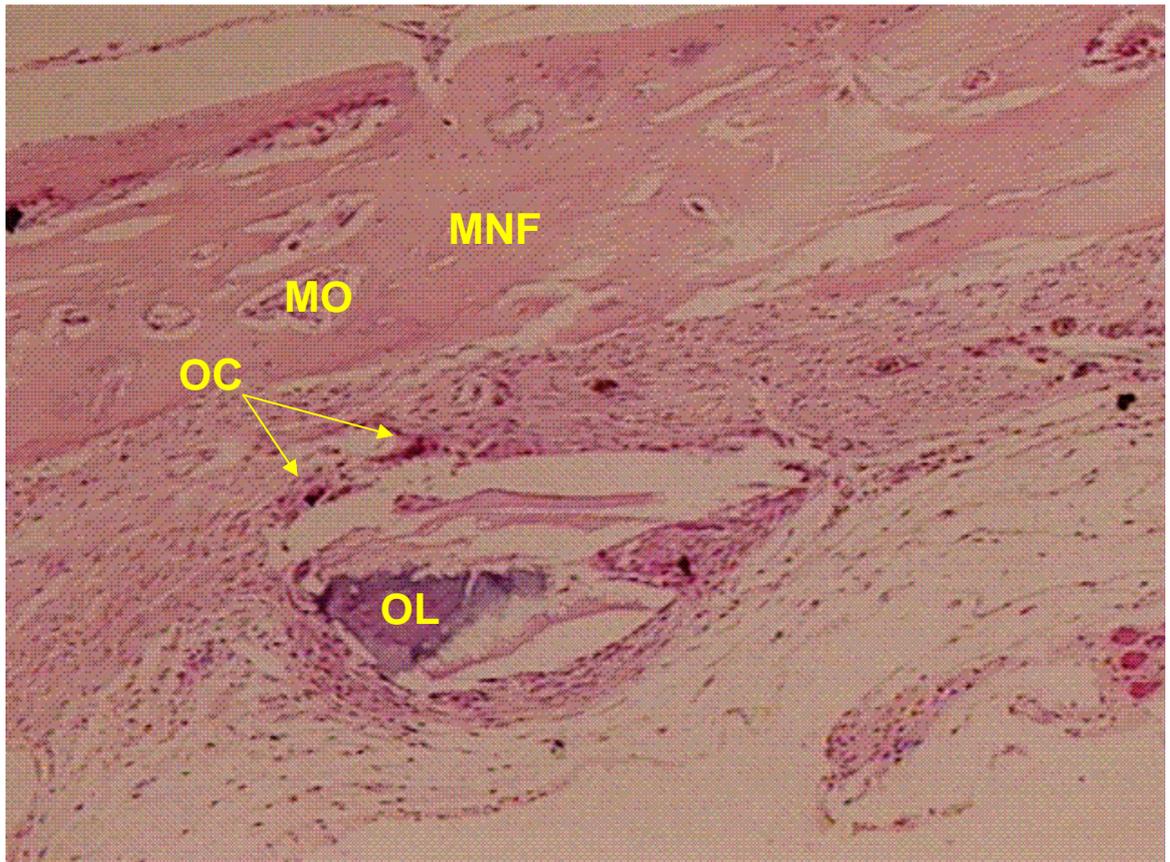
FIGURA 16 – Lâmina histológica de osso desmineralizado, corada com HE. Aumento de 400 vezes. Neste corte, há a presença de MO e de novas trabéculas.



MNF = matriz neoformada.

MO = medula óssea.

FIGURA 17 – Lâmina histológica de osso desmineralizado, corada com HE. Aumento de 400 vezes. Observa-se neste corte um fragmento de OL não totalmente reabsorvido, com osteoclastos ao seu redor.



MNF = matriz neoformada.

MO = medula óssea.

OC = osteoclastos.

OL = osso liofilizado.

ANEXO II – TABELAS

TABELA 1 – 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, isola-das, não ultrapassando 1/3 do campo micros-cópico |
| | 2 | Trabéculas isoladas ou anastomosadas, ocupan- do 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 apresenta atividade os-teoblástica |
| | 2 | Atividade observada entre 1/3 e 2/3 das trabéculas ósseas neo- formadas |
| | 3 | Mais de 2/3 das trabéculas neoformadas apresentam atividade os-teoblástica |
| 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 pre-sente |
| | 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 2 – VALORES DA ATIVIDADE FA ENCONTRADOS NOS
ENXERTOS ÓSSEOS.

| Grupo | Calota | OL4 | OL8 | CT+OL | AE |
|---------------|--------|------|------|-------|--------|
| | 20,35 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 15,16 |
| | 13,65 | 7,27 | 0,31 | 0,31 | 65,01 |
| | 4,10 | 0,85 | 0,90 | 0,90 | 0,67 |
| | 0,00 | 2,43 | 0,84 | 0,84 | 0,00 |
| | 5,32 | 0,00 | 2,50 | 2,50 | 95,78 |
| | 15,39 | 0,00 | 4,79 | 4,79 | 140,47 |
| | 6,58 | 1,70 | 4,36 | 4,36 | 72,69 |
| | 0,00 | 0,00 | 9,26 | 9,26 | 22,35 |
| | 0,00 | 0,00 | 0,78 | 0,78 | 0,00 |
| | 0,00 | 1,84 | 9,43 | 9,43 | 0,00 |
| | 0,00 | 0,00 | 2,55 | 2,55 | |
| | 0,00 | 3,48 | 1,25 | 1,25 | |
| | 41,09 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| | 13,20 | 0,00 | 1,88 | 1,88 | |
| | 0,00 | | 0,24 | 0,24 | |
| | 2,64 | | 0,00 | 0,00 | |
| | 0,00 | | 3,03 | 3,03 | |
| | | | 4,91 | 4,91 | |
| | | | 0,38 | 0,38 | |
| | | | 4,84 | 4,84 | |
| | | | 0,00 | 0,00 | |
| | | | | 0,00 | |
| | | | | 0,31 | |
| | | | | 0,90 | |
| | | | | 0,84 | |
| | | | | 2,50 | |
| | | | | 4,79 | |
| | | | | 4,36 | |
| Média | 6,80 | 1,21 | 2,38 | 16,50 | 41,21 |
| Desvio-Padrão | 10,75 | 2,00 | 2,84 | 19,52 | 49,62 |
| Mediana | 1,32 | 0,00 | 1,08 | 11,90 | 18,76 |
| P25 | 0,00 | 0,00 | 0,18 | 2,27 | 0,00 |
| P75 | 13,31 | 1,84 | 4,47 | 17,94 | 78,46 |

Valores expressos em unidades de fosfatase alcalina por miligramas de massa óssea dos enxertos.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE FA ENTRE OS GRUPOS. OS VALORES FORAM SUBMETIDOS A RANKING E, POSTERIORMENTE, AO TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE POST HOC DE BONFERRONI.

| Comparação | P |
|----------------|---------|
| Calota x OL4 | 1,000 |
| Calota x OL8 | 1,000 |
| Calota x CT+OL | 0,060 |
| Calota x AE | 0,506 |
| OL4 x OL8 | 1,000 |
| OL4 x CT+OL | 0,0001* |
| OL4 x AE | 0,021* |
| OL8 x CT+OL | 0,014* |
| OL8 x AE | 0,247 |
| CT+OL x AE | 1,000 |

* Estatisticamente Significativo ($P < 0,05$).

TABELA 4 – PREVALÊNCIA DE ATIVIDADE PRESENTE DA FA NAS
AMOSTRAS AVALIADAS.

| Grupo | N (%) | Resíduo Ajustado |
|--------|----------------|------------------|
| Calota | 9/18 (50%) | -2,0 |
| OL4 | 7/15 (46,7%) | -2,1 |
| OL8 | 17/22 (77,3%) | 0,9 |
| CT+OL | 25/29 (86,2%) | 2,4 |
| AE | 7/10 (70%) | 0,1 |
| Total | 65/94 (69,15%) | |

Qui-Quadrado de Pearson = 11,29.

P=0,024

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DA PONTUAÇÃO DA ESCALA
HISTOLÓGICA ENTRE OS GRUPOS.

| Grupo | OL4 | OL8 | OL+CT | AE |
|---------------|------|------|-------|------|
| | 7 | 9 | 4 | 2 |
| | 0 | 7 | 6 | 4 |
| | 0 | 4 | 8 | 10 |
| | 0 | 0 | 8 | 8 |
| | 2 | 7 | 6 | 5 |
| | 0 | 5 | 6 | 7 |
| | 0 | 7 | 9 | 5 |
| | 0 | 5 | 9 | 7 |
| | 4 | 6 | 8 | 8 |
| | 0 | 9 | 9 | 8 |
| | 1 | 8 | 7 | |
| | 0 | 6 | 10 | |
| | 1 | 5 | 0 | |
| | 0 | 9 | 3 | |
| | 0 | 1 | 0 | |
| | | 5 | 0 | |
| | | 5 | 0 | |
| | | 4 | 10 | |
| | | 0 | 0 | |
| | | 0 | | |
| | | 4 | | |
| | | 0 | | |
| | | 5 | | |
| | | 0 | | |
| Média | 1,00 | 4,46 | 5,42 | 6,40 |
| Desvio-Padrão | 2,00 | 3,05 | 3,79 | 2,37 |
| Mediana | 0,00 | 5,00 | 6,00 | 7,00 |
| P25 | 0,00 | 0,75 | 1,50 | 4,75 |
| P75 | 1,00 | 7,00 | 8,50 | 8,00 |

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA ENTRE OS GRUPOS. OS VALORES FORAM SUBMETIDOS A *RANKING* E TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE *POST HOC* DE BONFERRONI.

| Comparação | P |
|-------------|--------|
| OL4 x OL8 | 0,010* |
| OL4 x CT+OL | 0,001* |
| OL4 x AE | 0,001* |
| OL8 x CT+OL | 1,000 |
| OL8 x AE | 0,508 |
| CT+OL x AE | 1,000 |

* Estatisticamente Significativo ($P < 0,05$).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE
OSTEOCLASTOS ENTRE OS GRUPOS.

| Grupo | OL4 | OL8 | OL+CT | AE |
|---------------|-------|------|-------|------|
| | 10 | 1 | 2 | 22 |
| | 3 | 0 | 0 | 4 |
| | 10 | 0 | 4 | 0 |
| | 8 | 0 | 3 | 0 |
| | 12 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 3 | 3 | 0 |
| | 6 | 1 | 2 | 0 |
| | 12 | 9 | 5 | 0 |
| | 18 | 1 | 2 | 0 |
| | 10 | 1 | 4 | 0 |
| | 9 | 2 | 4 | |
| | 18 | 1 | 3 | |
| | 15 | 2 | 7 | |
| | 15 | 2 | 6 | |
| | 6 | 13 | 14 | |
| | | 11 | 10 | |
| | | 9 | 22 | |
| | | 8 | 6 | |
| | | 4 | 16 | |
| | | 20 | | |
| | | 8 | | |
| | | 8 | | |
| | | 14 | | |
| | | 12 | | |
| | | 7 | | |
| | | 36 | | |
| Média | 10,67 | 7,04 | 5,95 | 2,60 |
| Desvio-Padrão | 4,39 | 8,40 | 5,76 | 6,93 |
| Mediana | 10,00 | 3,50 | 4,00 | 0,00 |
| P25 | 8,00 | 2,00 | 2,00 | 0,00 |
| P75 | 15,00 | 7,00 | 7,00 | 1,00 |

TABELA 8 – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DA CONTAGEM DE OSTEOCLASTOS. OS GRUPOS FORAM SUBMETIDOS A *RANKING* E, POSTERIORMENTE, AO TESTE DE ANOVA, COM ANÁLISE *POST HOC* DE BONFERRONI.

| Comparação | P |
|-------------|--------|
| OL4 x OL8 | 0,034* |
| OL4 x CT+OL | 1,000 |
| OL4 x AE | 1,000 |
| OL8 x CT+OL | 0,329 |
| OL8 x AE | 0,003* |
| CT+OL x AE | 0,339 |

* Estatisticamente Significativo ($P < 0,05$).

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – LÍNGUA PORTUGUESA

Reconstrução de Calota Craniana com Células-Tronco Mesenquimais Indiferenciadas – Estudo Experimental.

Ciro Paz Portinho, Marcus Vinícius Martins Collares, Flávia Helena da Silva, Nance Beyer Nardi, Rinaldo De Angeli Pinto, Evandro Siqueira, Gustavo Morellato, Karin Sumino.

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

Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço Para Correspondência:

Ciro Paz Portinho

Rua Chiriguano, 117 – Vila Assunção – CEP 91900-570 – Porto Alegre – RS

Telefone: (0xx51) 8406-3076

Fax: 55-51-3066-4040

E-mail: cportinho@hotmail.com

Resumo

A cirurgia craniomaxilofacial utiliza enxertos freqüentemente para a reconstrução de perdas e deformidades esqueléticas. No entanto, essa rotina não é livre de problemas. Assim, técnicas novas vêm sendo estudadas. As células-tronco vêm ganhando notoriedade por sua capacidade potencial de regeneração. Dentro da cirurgia plástica e da engenharia de tecidos, elas poderão representar um arsenal importante para a reconstrução dos mais diversos tecidos, especialmente no caso das células-tronco mesenquimais (CTM). O objetivo deste estudo foi comparar a reconstrução parcial da calota craniana de camundongos, com enxertos que contivessem ou não CTM indiferenciadas. MÉTODO: Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6, fêmeas, adultas. Cada grupo foi composto inicialmente de 20 animais. Uma falha óssea de espessura total foi criada no osso parietal esquerdo do animal, medindo aproximadamente 5 x 3 mm. O grupo 1 (G1) foi reconstruído com osso liofilizado bovino (OL) e CTM. Já o grupo 2 (G2) (controle da matriz), apenas com OL. No caso do G1, o OL era deixado dentro da placa de cultivo por 24 horas antes do procedimento. Após quatro semanas, todos foram sacrificados em câmara de CO₂. Para a avaliação histológica, foram utilizados os seguintes critérios histológicos: trabéculas ósseas neoformadas, atividade osteoblástica, absorção do transplante; e viabilidade da medula óssea. RESULTADOS: Foram analisadas 15

amostras no G1 e 19 no G2. A comparação estatística demonstrou diferença significativa entre o G1 e o G2 ($P=0,002$). A utilização de CTM determinou uma pontuação histológica maior nas amostras utilizadas.

DISCUSSÃO: A utilização de CTM indiferenciadas nos enxertos ósseos de OL pareceu melhorar a integração e a regeneração na área receptora. A escala histológica utilizada baseou-se em quatro critérios importantes, que demonstram a presença de uma atividade regenerativa após uma enxertia. As CTM podem ter um papel primário ou adjuvante na regeneração tecidual. Tal papel ainda está por ser determinado.

CONCLUSÃO: Os enxertos contendo CTM indiferenciadas apresentaram resultados melhores, quando comparados àqueles sem combinação com células, do ponto de vista de regeneração histológica. O emprego de CTM pode significar uma melhoria na qualidade dos enxertos ósseos e uma otimização no tempo para a integração desses enxertos.

Descritores: transplante ósseo, célula-tronco, osso liofilizado.

Abstract:

INTRODUCTION: Bone graft employment is frequent in craniomaxillofacial procedures. Nonetheless, such routine is not free of troubles. This way, new techniques have been researched. Stem cells are becoming notorious for its regeneration potentials. For plastic surgery and tissue engineering, they may become an important arsenal for several tissue reconstructions, especially in the case of mesenchymal stem cells (MSC). The aim of this study was to compare murine partial cranial vault reconstruction, using grafts that contained undifferentiated MSC or not. **METHOD:** There were used adult female isogenetic mice C57Bl/6. Each group was initially composed of 20 animals. A whole thickness failure measuring 5 x 3 mm was performed in the left parietal bone. In group 1 (G1), reconstruction was made with bovine freeze-dried bone (FDB) and MSC. Group 2 (G2) (matrix-control group) received only FDB. For G1, FDB was left inside MSC culture plate for 24 hours before procedure. After four weeks, all the animals were sacrificed in CO₂ chambers. For histological evaluation, the following criteria were analyzed: new bone trabecules, osteoblastic activity, graft absorption, and bone matrix viability. **RESULTS:** Fifteen samples were analyzed in G1 and 19 in G2. Statistical comparison has demonstrated significant differences between G1 and G2 (P=0.002). MSC employment has determined a higher degree in histological scale. **DISCUSSION:** MSC utilized in FDB grafts seemed to improve integration

and regeneration in receptor area. Histological scale has been based on four important criteria, which have demonstrated the presence of regeneration activity after surgery. MSC may have a primary or adjuvant role in tissue regeneration. Such importance remains to be well established. CONCLUSION: Bone grafts containing undifferentiated MSC have better histological results, when compared to those without cells. MSC employment may represent an improvement in graft quality and optimization of the integration period.

Keywords: bone grafts, stem cells, freeze-dried bone.

Introdução

A cirurgia craniomaxilofacial utiliza enxertos freqüentemente para a reconstrução de perdas e deformidades esqueléticas. No entanto, essa rotina não é livre de problemas¹. As áreas doadoras podem tornar-se escassas; a cicatrização pode ser ineficiente em muitos casos²; alguns pacientes apresentam defeitos congênitos da ossificação; pode haver morbidade considerável na área doadora³.

Assim, técnicas novas vêm sendo estudadas, tanto no sentido de diminuir o tamanho das áreas doadoras como gerar enxertos com maior potencial de integração e regeneração, diminuindo a necessidade de reintervenções futuras.

A engenharia de tecidos (ET) é uma área biomédica relativamente nova⁴. Ela visa à reconstrução de tecidos e órgãos autógenos, através da expansão e diferenciação de amostras celulares *ex vivo*⁵. A manipulação pode ser feita em nível de células, matrizes ou mesmo estímulos biológicos⁶. Após o cultivo, essas amostras seriam reintroduzidas no organismo do paciente. Por se tratar de material autógeno, a preocupação com a rejeição imunológica a transplantes poderia tornar-se prescindível.

As células-tronco vêm ganhando notoriedade por sua capacidade potencial de regeneração^{7,8}. Dentro da cirurgia plástica e da ET, elas poderão representar um arsenal importante para a reconstrução dos mais diversos tecidos. Especialmente no caso das células-tronco mesenquimais

(CTM), podem ser precursoras importantes para o fornecimento das linhagens mesenquimais, como: osso, cartilagem, músculo, gordura e assim por diante⁹⁻¹¹.

O objetivo deste estudo foi comparar a reconstrução parcial da calota craniana de camundongos, com enxertos que contivessem ou não CTM indiferenciadas.

Método

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6, fêmeas, adultas, com massa entre 50 e 100 g. Cada grupo foi composto inicialmente de 20 animais. O grupo 1 (G1) foi reconstruído com OL e CTM. Já o grupo 2 (G2) (controle da matriz), apenas com OL.

Uma falha óssea de espessura total foi criada no osso parietal esquerdo do animal, medindo aproximadamente 5 x 3 mm (Figuras 1 e 2). A reconstrução foi realizada com um bloco de OL, fornecido pelo Banco de Osso do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esse bloco continha, no G1, CTM indiferenciadas cultivadas em uma concentração de aproximadamente 5×10^5 células/ml (Figura 3). Os cultivos foram preparados e fornecidos pela Equipe do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No caso do G1, o OL era deixado dentro da placa de cultivo por 24 horas antes do procedimento (Figura 4).

Após a cirurgia, os animais foram conduzidos a uma sala de recuperação e receberam tramadol injetável por 24 horas. Após quatro semanas, todos foram sacrificados em câmara de CO₂, conforme o protocolo da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisa – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O bloco de OL foi retirado para avaliação histológica. Nenhum osso nativo circunjacente foi levado junto. As amostras eram conduzidas imediatamente ao Laboratório de Patologia – Centro de Pesquisa – HCPA, para preparação histológica. A coloração utilizada foi com hematoxilina-eosina (HE) (Figuras 5 e 6).

Este trabalho seguiu as normas bioéticas estabelecidas pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – HCPA, da Unidade de Experimentação Animal – Centro de Pesquisas – HCPA e do *National Institutes of Health (NIRC)*.

Para a avaliação histológica, foram utilizados os critérios histológicos propostos por Ferreira (1997)¹², apresentados na Tabela 1. O critério de fusão de corticais foi retirado da avaliação neste estudo, porque poderia causar viés de aferição às análises bioquímicas futuras das amostras retiradas. O critério de número de osteoclastos também foi retirado porque se tratava de um número absoluto grande e que poderia distorcer a soma final da escala. O somatório da pontuação de cada critério permitiu uma análise semi-quantitativa dos resultados obtidos.

A análise estatística foi realizada com o Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para duas amostras independentes, uma vez que a natureza das variáveis era livre ou não-paramétrica. Foi considerada significativa uma diferença quando $P < 0,05$.

Resultados

Foram analisadas 15 amostras no G1 e 19 no G2. A comparação estatística demonstrou diferença significativa entre o G1 e o G2 ($P = 0,002$). A utilização de CTM determinou uma pontuação histológica maior nas amostras utilizadas, conforme demonstrado na Tabela 2.

Discussão

Utilizaram-se animais transgênicos para facilitar a interação entre os cultivos e os organismos receptores. Utilizamos animais adultos porque a regeneração é menor; além disso, há maior absorção óssea nos imaturos^{13,14}.

A utilização de CTM indiferenciadas nos enxertos ósseos de OL pareceu melhorar a integração e a regeneração na área receptora. A escala histológica utilizada baseou-se em quatro critérios importantes, que demonstram a presença de uma atividade regenerativa após uma enxertia.

Utilizamos o período de quatro semanas para a avaliação das condições do enxerto no sítio receptor. Esse período é condizente com aquele já observado por vários autores^{3,10,15,16}.

O OL é oriundo de um Banco de Osso reconhecido pelo Ministério da Saúde, e que fornece enxertos de qualidade elevada. Trata-se do mesmo material utilizado em cirurgias ortopédicas do HCPA.

Não foi possível avaliar, neste estudo, alguns critérios importantes, como fusão de corticais e resistência da área reconstruída. Para o último, animais maiores serão necessários.

As CTM podem ter um papel primário ou adjuvante na regeneração tecidual. Para determinar isso, far-se-á necessário um acompanhamento molecular de seu comportamento na área receptora, esclarecendo se ela faz a regeneração ou estimula outros grupos celulares a executá-la. A marcação dessas células com genes repórteres pode ser uma opção adequada.

Conclusões

Os enxertos com CTM indiferenciadas apresentaram resultados melhores, quando comparados àqueles sem combinação com células, do ponto de vista de regeneração histológica. O emprego de CTM pode significar uma melhoria na qualidade dos enxertos ósseos e uma otimização no tempo para a integração desses enxertos.

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.

Referências Bibliográficas

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. *Int J Mol Med* 2005; 15(6):899-905.

6. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *J Clin Orthop* 2002; 395:66-80.
7. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 2005; 124(2):201-8.
8. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16:498-502.
9. Sylvester, KG, Longaker, MT. Stem Cells: Review and Update. *Arch Surg* 2004; 139:93-99.
10. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003; 82(12):976-81.
11. Pereira RF, O'Hara M, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R et al. 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.
12. Ferreira JCR. Avaliação cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático. Estudo experimental em coelhos (Tese de Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1997. 128p.
13. 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.

14. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27:859-74.
15. Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes, DL, Cochran DL, Dean DD et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121(10):583-90.
16. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, De La Fontaine J, Cochran DL, Dean DD et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 1996; 67:918-26.

Tabela 1 – Critérios de avaliação histológica dos enxertos.

| 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 |
| Atividade osteoblástica | 3 | Trabéculas espessas, predominantemente anastomosadas, ocupando mais de 2/3 do campo microscópico |
| | 0 | Atividade inexistente |
| | 1 | Menos de 1/3 das trabéculas neoformadas apresenta 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 |
| 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 2 – Pontuação histológica dos grupos estudados.

| | Média ± Desvio-Padrão | Mediana; Percentil 25 e 75 |
|----|-----------------------|----------------------------|
| G1 | 5,42±3,79 | 6; [0;9] |
| G2 | 1,00±2,00 | 0; [0;1] |

Figura 1 – Esquema gráfico da técnica cirúrgica. A linha arciforme representa a incisão na pele sobre a calota craniana, entre as orelhas, iniciando na região occipital e estendendo-se até a região parietal direita, afastando-se ao máximo da região de craniotomia, impedindo que esta área fique em contato com a ferida operatória após o fechamento do escalpo. A área retangular representa a área de craniotomia parietal esquerda, medindo 3 x 5 mm aproximadamente, realizada com broca de perfuração (6 furos) e osteotomia com tesoura ou mesmo com broca de corte.

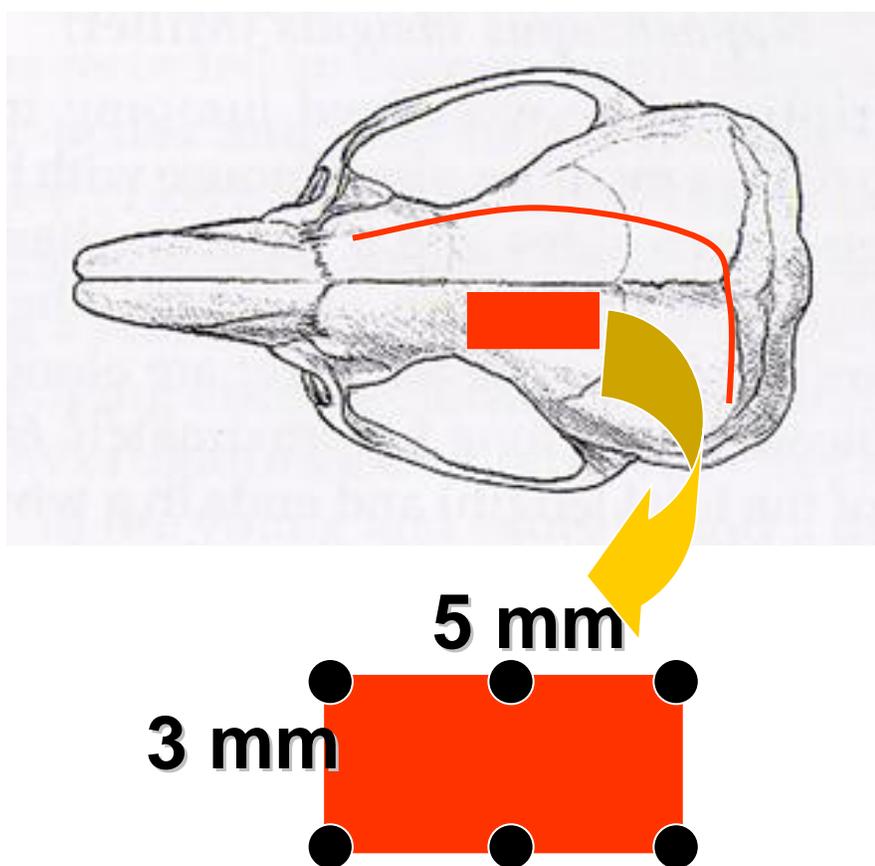


Figura 2 – Imagem da craniotomia. Note-se o fragmento inteiro, retirado na forma de um retângulo de 5 x 3 mm. A utilização de um descolador de periósteo delicado permitiu a manutenção da integridade meníngea.



Figura 3 – Cultivo de CTM murinas. Ampliação: 100 vezes.

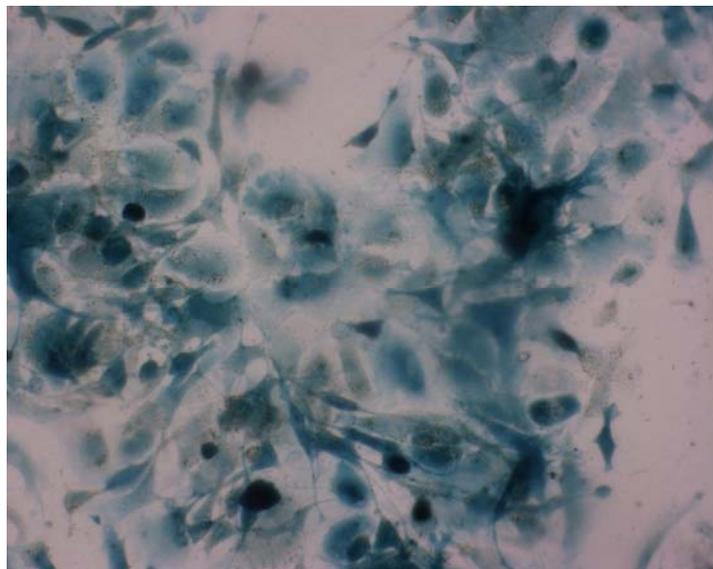


Figura 4 - Osso liofilizado fragmentado, após ter sido colocado em meio de cultivo celular contendo células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

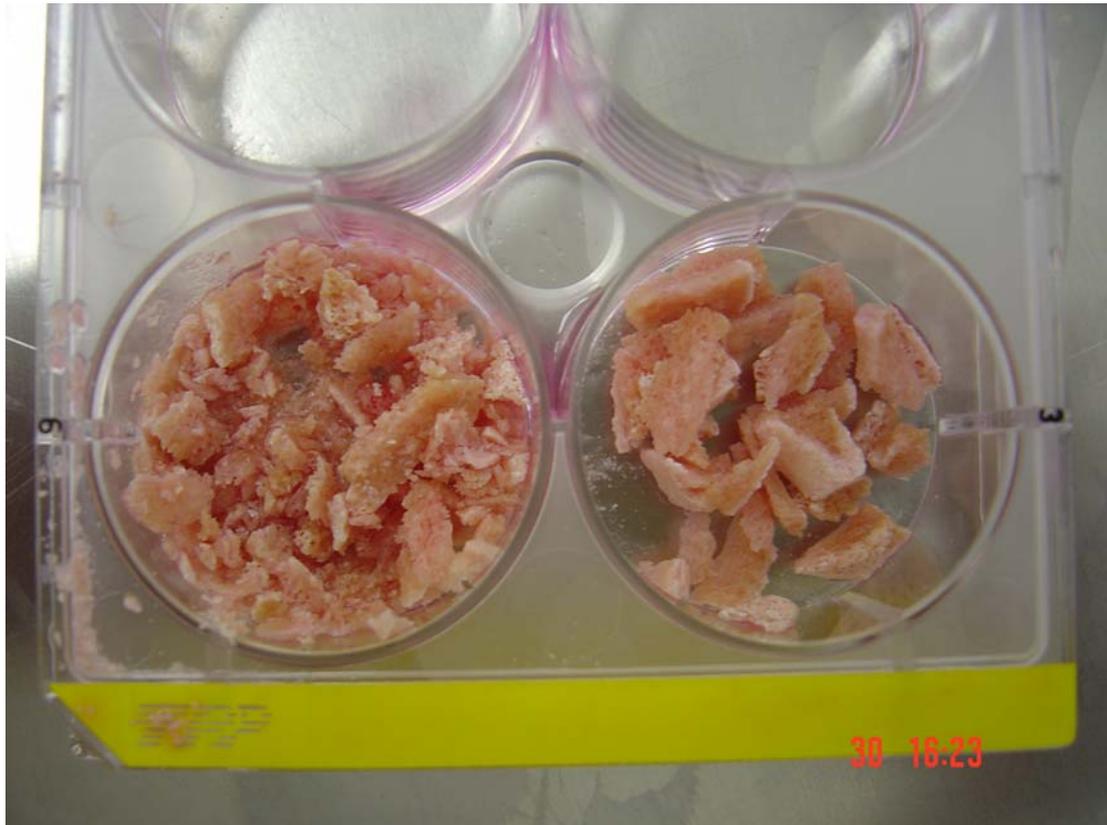


Figura 5 – Lâmina histológica de enxerto ósseo com células-tronco mesenquimais, corada com hematoxilina-eosina, após quatro semanas da cirurgia. Aumento: 400 vezes. (MNF: matriz neoformada. MO: medula óssea.)

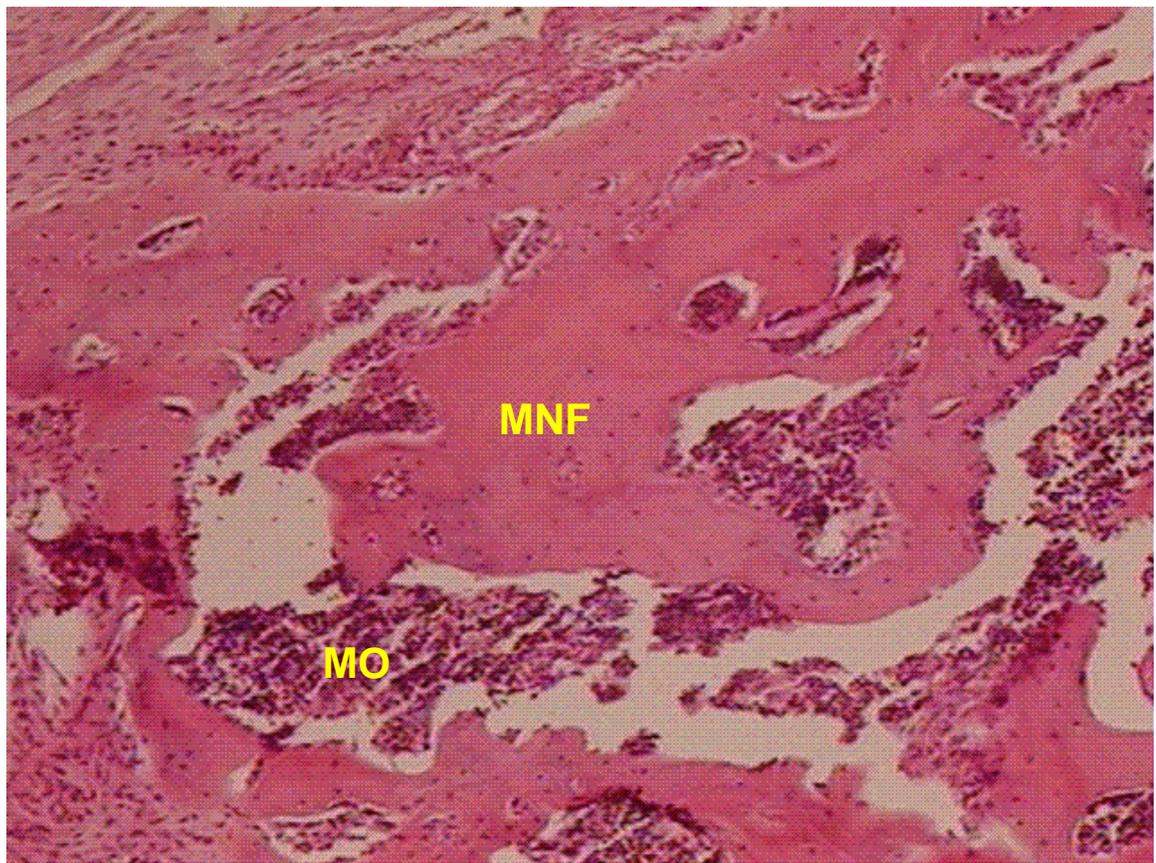
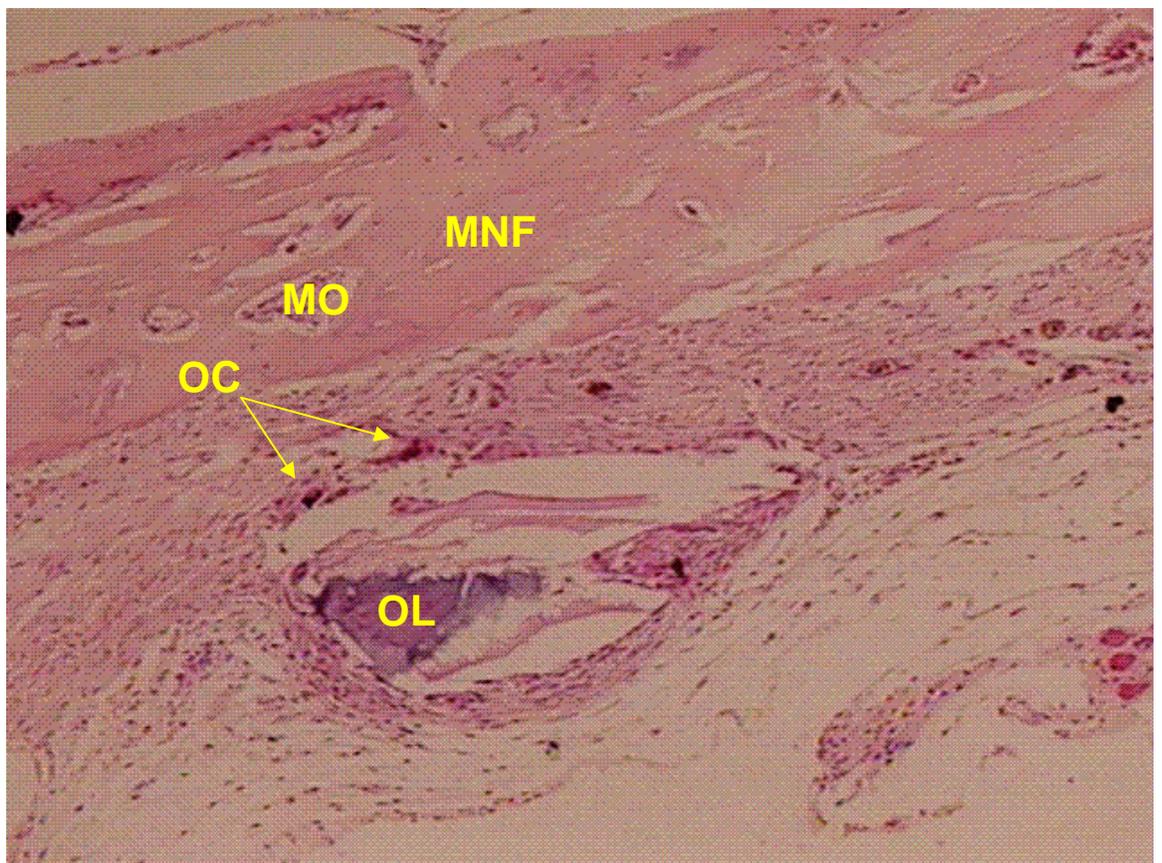


Figura 6 – Lâmina histológica de osso liofilizado, corada com hematoxilina-eosina, após quatro semanas da cirurgia. Observa-se neste corte um fragmento de osso liofilizado não totalmente reabsorvido, com osteoclastos ao seu redor. Aumento: 400 vezes. (MNF: matriz neoformada, MO: medula óssea. OC: osteoclasto. OL: osso liofilizado.)



ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – LÍNGUA INGLESA

EXPERIMENTAL CRANIAL VAULT RECONSTRUCTION WITH MESENCHYMAL STEM CELL GRAFTS AND FREEZED-DRIED BONE

Ciro Paz Portinho, MD¹

Marcus Vinícius Martins Collares, MD, PhD²

Nance Beyer Nardi, MSc, PhD³

Flávia Helena Silva, MSc⁴

Lindolfo da Silva Meirelles, MSc⁵

Carmen Pilla, MSc, PhD⁶

Luíse Meurer, MD, MSc, PhD⁷

Márcia Riboldi⁸

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

1. *MD. Plastic Surgeon. Researcher of CMFD – PSD - HCPA*
2. *MD, PhD. Plastic Surgeon. Head of CMFD – PSD – HCPA –. Professor of Surgery Postgraduate Program – MS – UFRGS.*
3. *Geneticist, MSc, PhD. Professor of Genetics Department (GD) – UFRGS. Head of Immunogenetics Laboratory – GD – UFRGS.*
4. *Geneticist, MSc. Immunogenetics Laboratory (IGL) – GD – UFRGS.*

5. *Geneticist, MSc. IGL – GD – UFRGS.*
6. *Head of Clinical Pathology Laboratory (CPL) – Research Center (RC) – HCPA.*
7. *MD, MSc, PhD. Pathologist. Professor of Pathology Department – MS – UFRGS.*
8. *Biomedicine Specialist – CPL Research Fellow – RC – HCPA.*

Address:

Rua Chiriguano, 117 – Bairro Vila Assunção

CEP 91900-570 – Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (0xx51) 3207-9717/3314-8580/3066-4040

FAX: 55-51-3314-8580/3066-4040

E-mail: cportinho@hotmail.com

ABSTRACT

Inherited malformations and bone loss due to tumors, infections or trauma may represent a challenge in reconstructive surgery of the face. Bone graft employment is frequent in craniomaxillofacial procedures. Donor areas usually are: divided cranial vault, ribs, maxilla and mandible sites or iliac crest. Membranous autogenous bone grafts (ABG) are the gold-standard ones, but the availability of donor areas may become restrained in some patients or after several surgeries. Many papers have been made in order to search for adequate bone substitute materials. Tissue engineering (TE) researches new ways of tissue production, including those for reconstructive surgeries. TE is multidisciplinary and includes all of the methods and efforts to project, produce, modify, expand and maintain alive specific tissues in specific sites. Stem cells (SC) may be utilized in TE and may also contribute to tissue and organ repair and regeneration.

OBJECTIVE: To compare integration e regeneration capacity of bone grafts, used to a partial cranial vault reconstruction in mice, either with adult mesenchymal SC or not.

METHOD: It was used adult female isogenetic mice C57Bl/6. A whole thickness failure measuring 5 x 3 mm was performed in the left parietal bone. This failure was reconstructed in three different ways. The following groups (G) were studied: G1 – cranial vault fragment taken during craniotomy; G2 – freezed-dried bone (FDB) after four postoperative weeks (POW); G3 – FDB after eight postoperative

weeks (POW); G4 – SC+FDB after four POW; G5 – ABG after four POW.

RESULTS: The prevalence of positive activity of alkaline phosphatase was considered among groups. The group with the highest number of positive samples was G4 (86.2%) and the one with the lowest number was G2 (46.7%). Groups were compared by using Pearson's Chi-Square Test, that showed a statistical significant difference among them (Chi-Square = 11.29; $P=0.024$). G4 had the highest adjusted residue, 2.4. Significant differences were found between G2 and G4 ($P=0.0001$; Ranking, ANOVA Test with Bonferroni test for post hoc analysis), and also between G3 and G4 ($P=0.0014$). Histological analysis was made according to the following criteria: new bone trabecules; osteoblastic activity; graft absorption; bone marrow viability. Osteoclastic activity was analyzed separately. Significant differences were found between G2 and G3 ($P=0.010$; Ranking, ANOVA Test with Bonferroni test for post hoc analysis), between G2 and G4 ($P=0.001$). Osteoclastic counting was higher in G2 and G3, groups with no cells inside the graft. Significant differences were found between G2 and G3 ($P=0.034$; *Ranking*, Test ANOVA with Bonferroni test for post hoc analysis), and between G3 and G5 ($P=0.003$).

CONCLUSION: Experimental cranial vault reconstruction with SC shows favorable results for regeneration, which may be close to ABG, the gold-standard graft for reconstruction.

KEYWORDS: bone graft; freezed-dried bone; stem cells.

INTRODUCTION

Inherited malformations and bone loss due to tumors, infections or trauma may represent a challenge in reconstructive surgery of the face (Shang, 2001). In such procedures, bone graft employment is frequent. Donor areas usually are: divided cranial vault, ribs, maxilla and mandible sites or iliac crest (Portinho, 2006; Silva, 2000; Conrad, 1993; Lemperle, 1998). Literature has several clinical and experimental studies (Delacure, 1994; 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).

Nonetheless, availability of bone donor areas may become scarce in some patients or even after several surgical procedures (Brodie, 2005; Lucarelli, 2004). Besides, osteochondral healing may be inefficient in many cases (Issack, 2003). A great number of studies have been made in order to search for adjusted bone substitute materials. In such situations, when there is a great bone deficit, or even to diminish procedure duration and morbidity, alternatives are being searched.

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). TE techniques, combined to gene therapy, may increase osteogenesis and bone graft production. More than that, TE is becoming a clinical reality.

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) (Pereira, 1998). 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).

Utilization of adult SC may represent a promising alternative route to embryonic SC and their impediments. It has been demonstrated that adult organisms have reserves of SC and the major source is BM, whose SC demonstrate an almost pluripotent differentiation capability, including (in animal models) a potential do differentiate in several mesenchymal, endodermic and ectodermic types (Pittenger, 1998). As these cells can be easily harvested and cultivated *ex vivo*, these new concept opens plenty of possibilities for their usage in regenerative medicine, in autologous systems and therefore do not have immunological rejection concerns.

Many efforts have been made to isolate and define the type of cell that derives from BM and leads to adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts (Sylvester, 2004).

The purpose of this paper is to compare integration e regeneration capacity of freeze-dried bone grafts, used to a partial cranial vault reconstruction in mice, with or without adult mesenchymal SC.

METHOD

An experimental, open, comparative, and prospective study was assembled. There were used adult female isogenetic 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.

Animal anesthesia was performed with ketamin (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Antisepsis was performed with iodine alcohol-free solution. A scalp flap was made, as the incision was made from the occipital to the right parietal area (Figures 1 and 2). This way, the bone work region remained not so close to the surgical wound, preventing exposure to the environment.

With a dentist drill #701, a whole thickness failure was performed in left parietal bone, measuring 5 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.

Bone failure was reconstructed in three different ways. In group 1 (G1), SC and freeze-dried bone (FDB) block were employed; in group 2 (G2), only FDB block; at last, in group 3 (G3), bone reconstruction was performed with autogenous bone graft (ABG). We also utilized craniotomy bone fragment to set basal levels of metabolism.

FDB was supplied by HCPA Bone Bank (Porto Alegre, Brazil). Such division is regularized by Brazilian Health Ministry.

FDB has been used in a large scale for orthopedic procedures. Besides, FDB has adequate osteoconductibility, although not osteoinductibility (Lohmann, 2001). Finally, Brazil is a country free of bovine spongiform disease.

FDB properties vary according to donor age, porosity and stockage (Schwartz, 1996). Thus, a unique block of this material was used for all of the groups in this study.

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

Cell cultures (Figure 3) 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 5×10^5 cells/ml.

After four weeks, animals were sacrificed. A CO₂ gas chamber was used for that purpose (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 also evaluated in 8 weeks, in order to evaluate these matrix without any effect of mesenchymal SC.

We utilized pilot groups to determine bone critical failure. As already demonstrated (Portinho, 2006; Yoshikawa, 1999), we had created rectangular failures. Each failure was made in the left parietal bone, measuring 3 x 5 mm, with the greater measure parallel to sagittal plane. Ten animals have been employed in the pilot study, and all of them were alive after eight weeks. None of the failures have closed spontaneously. Scalp incision was located on occipital and right-parietal regions, far from the bone failure.

We've evaluated histological and biochemical features in each group. Results were compared and statistical analysis was performed among them. Such evaluation was made after four weeks of surgery, and another one was made for FDB at eight weeks. Bone block previously grafted in left parietal bone was removed by osteotomy. No native bone was taken together to prevent measurement errors in alkaline phosphatase (AP) levels. Half this bone fragment was sent to histology, fixated in formalin and colored with hematoxilin-eosin dye. The other half was placed in 0.9% NaCl and sent to biochemical evaluation on the same day.

A histological scale (Figures 4 and 5) was used previously (Portinho, 2006). 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 which 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). For choosing the best incubation system for AP activity measurement, time and concentration curves were analyzed. Such study allowed a decrease in incubation time, previously determined as 30 minutes, to 5 minutes; besides, we have found the adequate dilution to our assays. 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: ANOVA test, with Bonferroni post hoc test for continuous variations; and Chi-square test for categorical variables. A significant difference was determined if $P < 0.05$ and 95% confidence interval did not cross 1.00. Specific statistical softwares, such as SPSS and Epi Info, were used in this study.

RESULTS

Biochemical Analysis

Significant differences were found between G2 and G4 ($P=0.0001$; Ranking and ANOVA test, with Bonferroni post hoc analysis), and also between G3 and G4 ($P=0.014$).

The group with a higher percentage of enzymatic activity was G4 (86.2%), and the lowest was G2 (46.7%). A Pearson's Chi-Square Test was performed for multiple analysis, and it has demonstrated significant differences between groups (Chi-Square=11.29; $P=0.024$). G4 had the highest adjusted residue, 2.4.

Histological Analysis

Such analysis (Table 1) was performed according to a validated histological scale (Portinho, 2006), excluding the criteria “cortical fusion” and “osteoclastic activity”. The latter was analyzed separately.

There has been significant differences between G2 and G4 ($P=0.010$), between G2 and G4 ($P=0.001$), and between G2 and G5 ($P=0.001$). For such statistical analysis, the sum of scale points was submitted to a ranking and ANOVA test, with Bonferroni post hoc analysis. Osteoclastic activity was analyzed solely. The countage of these cells was higher in G2 and G3, what means, in groups without cells inside the graft. Significant differences were found between G2 and G3 ($P=0.034$), and between G3 and G5 ($P=0.003$). Statistical tests were applied in the same manner as it has been already described.

DISCUSSION

In this experiment, we have chosen C57BL/6 mice because of its facility to use isogenetic cultures and animals. Adult animals were necessary because regeneration is diminished; besides, there is an increased absorption in the youngest (Delacure, 1994; Riley, 1996). Females were chosen because it could allow for Y chromosome labeling, once all cultures in Immunogenetics Laboratory were originated from males.

Bone regeneration was evidenced in all studied groups. Even so, SC addition to FDB matrix significantly increased bone regeneration. Results

with SC+FDB were close to the gold standard group. This could be verified by either biochemical (AP) or histological gauging.

Differences in AP levels after four weeks reveal a higher metabolic activity in SC group. Such difference is strengthened by the number of sample with positive activity of AP, which was higher in SC+FDB. Interaction between SC and FDB has demonstrated superiority compared to other groups with allogeneous reconstruction.

The results of reconstruction only with FDB after four weeks were worst than those when SC were associated. After eight weeks, biochemical and histological patters showed improvement, although it denotes slowness of regenerative process when a matrix with no cells is employed. The period of four weeks seems sufficient to observe regeneration, and it agrees with other authors' opinions, like Brodie et al. (2005), Batouli et al. (2004), Lohmann et al. (2001), and Schwartz et al. (1996). Batouli et al (2004) have established that even with only two weeks osteogenesis may be detectable.

AP is an enzyme that may be originated from several tissues in the body. Yet, we have employed a method to measure its concentration only in the graft, in order to prevent other font bias. This analysis, however, forced us to discard an important histological criterion, the cortical fusion. To allow such analysis, autogenous bone margins should have been harvested from mice parietal bone. This could distort AP levels and invalidate

measurement. As cortical fusion is important, a future study may be projected to allow its evaluation.

Osteoclastic activity was higher in all groups which worked with FDB. It is interesting to observe that SC+FDB had the lowest number of these cells when compared to FDB after four weeks. Nonetheless, this comparison was not statistically significant.

SC role in regeneration areas must be better studied. It is not known yet if such cells have a main or secondary function. Report genes may answer at least part of these doubts.

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.

CONCLUSION

Experimental cranial vault reconstruction with SC shows favorable results for regeneration, either by biochemical or histological aspects. The addition of such cells has demonstrated results close to ABG – the gold-standard graft for reconstruction – and significantly different from isolated FDB after four weeks.

Subsequent studies will be necessary to improve integration, regeneration, and differentiation of craniofacial bone tissue with TE protocols.

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.

References:

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. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Gehron-Robey P, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82(12):976-81.
3. 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.
4. 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.
5. Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. *Clin Orthop Rel Res* 1993;290:279-84.
6. Delacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am* 1994;27:859-74.

7. Deluca L, Raszewski R, Tresser N, Guyuron B. The fate of preserved autogenous bone graft. *Plast Reconstr Surg* 1997;99(5):1325-8.
8. 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.
9. Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. *Int J Mol Med* 2005;15(6):899-905.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Jones NC, Trainor PA. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. *Expert Opinion Biol Ther* 2004;4(5):645-57.

14. Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE. Bone 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.
15. 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.
16. 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.
17. Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123(4):702-11.
18. 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.
19. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999;360:71-86.

20. 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.
21. Portinho CP, Collares MVM, Silva FH, Nardi NB, Pinto RDA. *Rev Soc Bras Cir Plast* 2006;21(3):161-5.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Sylvester, KG, Longaker, MT. Stem Cells: Review and Update. *Arch Surg* 2004;139:93-99.

27. Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft-bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol* 1999; 88(3): 186-92.

Figure 1 – Surgery scheme. Red arciform line shows skin incision. Rectangular area represents left parietal craniotomy (3 x 5 mm), performed with a #701-dentistry drill (6 holes). After that, osteotomy was performed and bone fragment was raised and removed with a soft periosteum dissector.

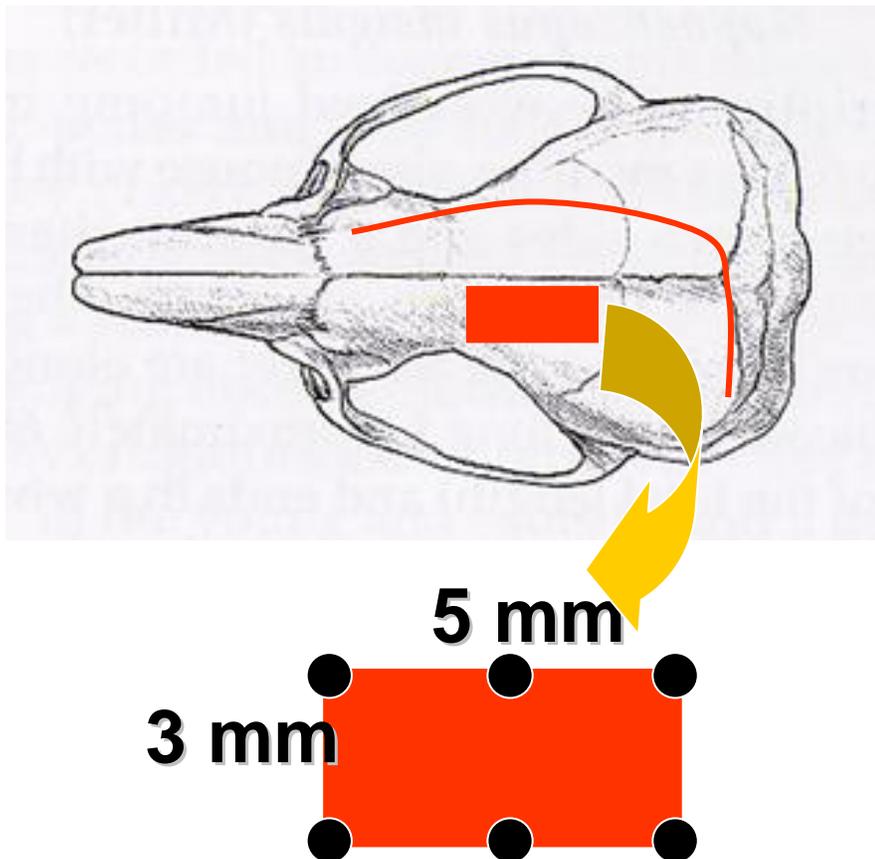


Figure 2 – Image after craniotomy. Bone fragment appears besides bone failure.



Figure 3 – Murine stem-cell culture. Magnification: 100x.

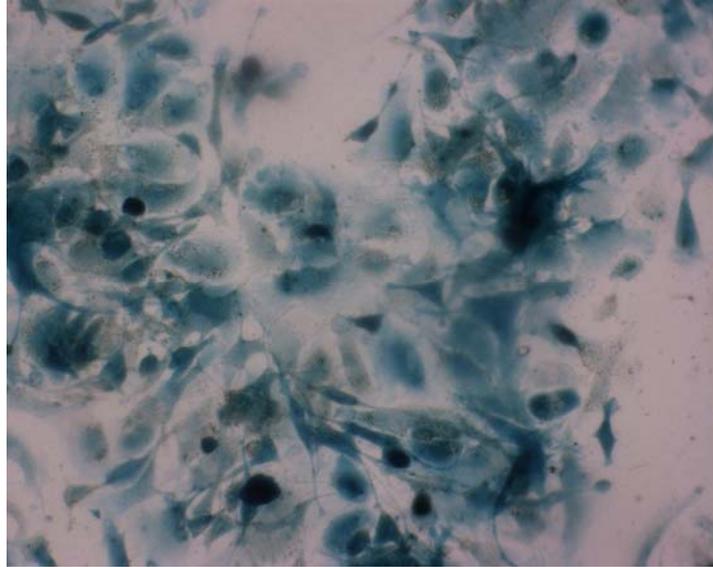


Figure 4 – Histological analysis of demineralized bone (hematoxylin-eosin stain; 400-time magnification). This image shows bone marrow (BM) presence and new bone trabecles (NBT).

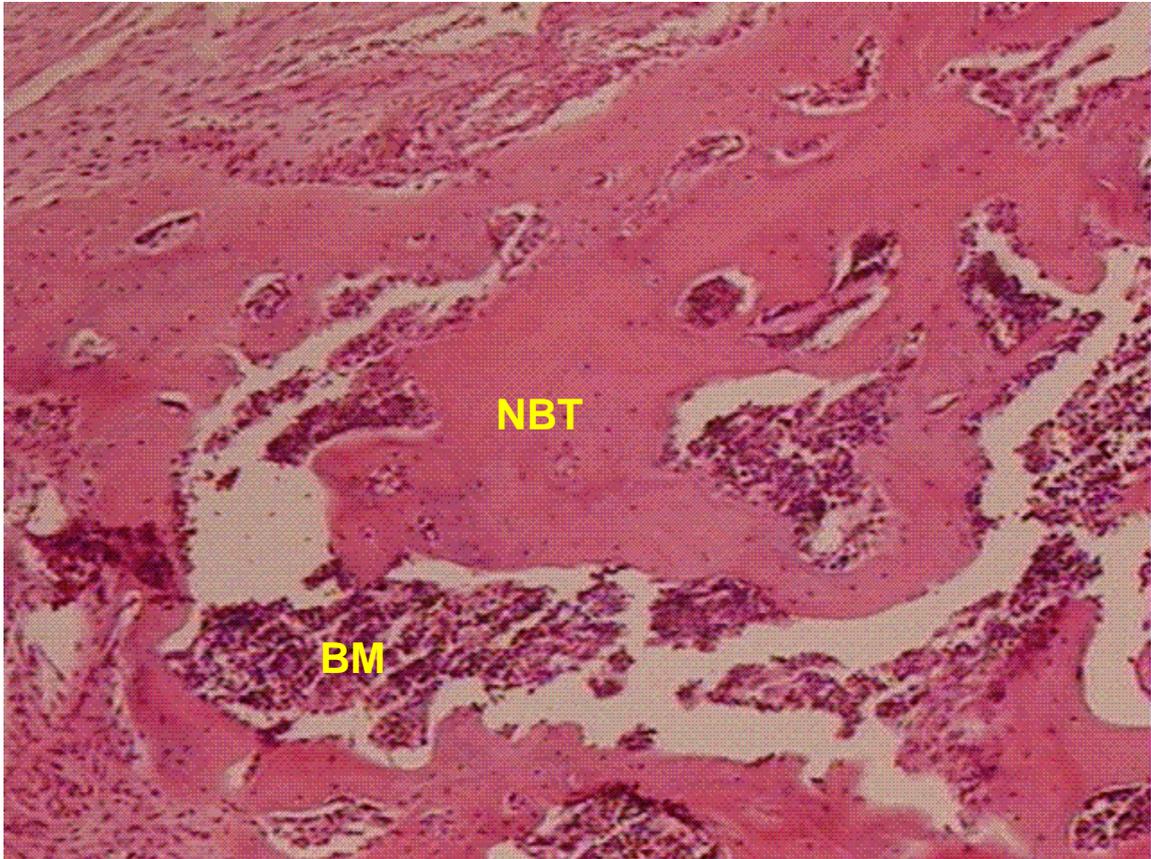


Table 1 – Histological scale points in each group.

| Group | G2 | G3 | G4 | G5 |
|------------------------|------|------|------|------|
| | 7 | 9 | 4 | 2 |
| | 0 | 7 | 6 | 4 |
| | 0 | 4 | 8 | 10 |
| | 0 | 0 | 8 | 8 |
| | 2 | 7 | 6 | 5 |
| | 0 | 5 | 6 | 7 |
| | 0 | 7 | 9 | 5 |
| | 0 | 5 | 9 | 7 |
| | 4 | 6 | 8 | 8 |
| | 0 | 9 | 9 | 8 |
| | 1 | 8 | 7 | |
| | 0 | 6 | 10 | |
| | 1 | 5 | 0 | |
| | 0 | 9 | 3 | |
| | 0 | 1 | 0 | |
| | | 5 | 0 | |
| | | 5 | 0 | |
| | | 4 | 10 | |
| | | 0 | 0 | |
| | | 0 | | |
| | | 4 | | |
| | | 0 | | |
| | | 5 | | |
| | | 0 | | |
| Average | 1.00 | 4.46 | 5.42 | 6.40 |
| Standard- Deviation | 2.00 | 3.05 | 3.79 | 2.37 |
| Median | 0.00 | 5.00 | 6.00 | 7.00 |
| P25 | 0.00 | 0.75 | 1.50 | 4.75 |
| P75 | 1.00 | 7.00 | 8.50 | 8.00 |