

Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico

Bovine non-demineralized lyophilized bone with mesenchymal stem cells for tissue engineering: experimental study in heterotopic site

VICTOR VIEIRA ORSI¹, MARCUS VINÍCIUS MARTINS COLLARES², NANCE BEYER NARDI³, RINALDO DE ANGELI PINTO⁴, LINDOLFO DA SILVA MEIRELLES⁵, LUÍSE MEURER⁶, CARMEN PILLA⁷, CIRO PAZ PORTINHO⁸, MÁRCIA RIBOLDI⁹, TAIS BAUER AULER¹⁰

RESUMO

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

Descritores: Células-tronco mesenquimais. Engenharia tissular. Liofilização. Osso.

1. Cirurgião Plástico, Mestrando em Cirurgia, Unidade de Cirurgia Craniomaxilofacial (UCC), Serviço de Cirurgia Plástica (SCP) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). 2. Cirurgião Plástico, Doutor, Chefe da UCC – SCP. HCPA. 3. Geneticista, Doutora, Laboratório de Imunogenética (LI) – Departamento de Genética (DG) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 4. Cirurgião Plástico, Doutor, Diretor do SCP. HCPA. 5. Geneticista, Mestre, LI – DG – UFRGS. 6. Médica patologista, Mestre e Doutora em Gastroenterologia – Departamento de Patologia, UFRGS. 7. Farmacêutica, Doutora, Laboratório de Patologia Clínica (LPC) – HCPA – UFRGS. 8. Cirurgião Plástico, Mestre em cirurgia, UCC – SCP. HCPA – UFRGS. 9. Biomédica; LPC – HCPA – UFRGS. 10. Acadêmica de Biomédica; LPC – HCPA – UFRGS.

SUMMARY

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

Descriptors: Mesenchymal stem cells. Tissue engineering. Freeze drying. Bone.

Correspondência: Victor Vieira Orsi
Rua Vieira de Castro, 275/401 – Bairro Farroupilha – Porto Alegre – RS
CEP 90040-320 – Tel: (51) 9977-4432 – Fax: (51) 3311-0075
E-mail: victor.orsi@brturbo.com.br

INTRODUÇÃO

Em cirurgias craniomaxilofaciais, freqüentemente é necessária a reparação de perdas ósseas com uso de enxertos. Ainda que o enxerto ósseo autólogo seja considerado o melhor material para este propósito (padrão-ouro)^{1,2}, em algumas situações, quando grandes quantidades de tecido são necessárias ou visando à diminuição da morbidade cirúrgica nas zonas doadoras, pode ser adequado o uso de materiais de substituição óssea^{3,4}. Os enxertos ósseos homólogos ou xenólogos são opções importantes, devido à similaridade com o osso autólogo em termos de estrutura e função⁵. Entretanto, os enxertos não-autólogos exigem processos de preparo, como a liofilização, com o objetivo de diminuir a imunogenicidade, diminuir o risco de transmissão de doenças do doador para o receptor, e facilitar o armazenamento do material⁶⁻⁹.

O processo de liofilização elimina o componente celular do enxerto ósseo, suprimindo com isso a sua capacidade osteogênica^{5,7}. Os enxertos ósseos liofilizados mantêm somente a capacidade de osteocondução e, dependendo do processamento empregado, de osteoindução^{5,10-12}. A engenharia tecidual com células-tronco traz uma perspectiva importante de agregar qualidade aos materiais de substituição óssea, pois permite adicionar componente celular autólogo ao material e, com isso, conferir-lhe a propriedade osteogênica^{5,13,14}. A medula óssea representa uma fonte particularmente atrativa de células estromais com potencial osteogênico¹⁵ para essa finalidade, visto que existem formas estabelecidas de obtê-las, de separar as células-tronco mesenquimais, e de expandi-las e diferenciá-las em cultura *ex vivo*¹⁶. Diversos autores têm demonstrado o potencial das células-tronco mesenquimais em reconstituir tecido ósseo em modelos experimentais *in vivo*¹⁷⁻¹⁹.

A interação entre as células-tronco mesenquimais e os biomateriais que servirão como estruturas tridimensionais (*scaffolds*) é de grande importância para o sucesso da engenharia tecidual óssea²⁰⁻²². Mauney et al.⁵ demonstraram recentemente que matrizes ósseas xenólogas (de origem bovina), tanto desmineralizadas como não-desmineralizadas, podem ser utilizadas como estrutura carreadoras de células-tronco para engenharia tecidual óssea. Entretanto, são poucos os estudos na literatura que exploram o uso de matrizes ósseas liofilizadas como carreadoras celulares para engenharia tecidual óssea²³.

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

MÉTODO

Animais

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

bovino não-desmineralizado (OL) associado a diferentes grupos celulares:

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

Preparo dos blocos de osso liofilizado

Foi utilizado osso liofilizado (OL) não-desmineralizado de origem bovina, fornecido pelo Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Como existe divergência na literatura sobre a propriedade osteoindutiva do osso liofilizado não-desmineralizado, e acredita-se que a idade do doador pode influir nessa propriedade¹⁰, tomou-se o cuidado de utilizar material proveniente do mesmo animal, ao longo de todo o projeto. Foi utilizada somente a porção medular da cabeça femoral, visando à obtenção de macroestrutura porosa homogênea. A secção dos blocos, com dimensões de 8x8x2mm, foi realizada previamente ao processo de liofilização.

O osso liofilizado bovino não-desmineralizado obtido seguindo o protocolo de liofilização do Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA tem características químicas, histológicas, biomecânicas e de biocompatibilidade já descritas em estudos prévios^{8,23,24}. Tendo em vista a utilização do material para uso em contato com células em cultura, o protocolo foi modificado, visando a evitar o risco de toxicidade celular, aumentando o tempo de aeração após uso de agentes desengordurantes voláteis, de 24 horas para 14 dias. O protocolo incluiu a esterilização do material ao final do processo, em autoclave por 10 minutos a 121°C; e empacotamento em embalagens gás-permeáveis. Antes de colocar os blocos em contato com as células, foram imersos no meio de cultura até haver estabilização do pH.

Cultivo celular

Foram utilizadas células da medula óssea de camundongos da linhagem isogênica C57Bl/6 – mesma linhagem dos animais receptores dos construtos ósseos. As etapas de obtenção das células da medula de ossos longos, separação e cultura das células plástico-aderentes, assim como a etapa de diferenciação osteogênica *in vitro*, foram realizadas no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – com os métodos previamente descritos por Meirelles et al.¹⁶.

- **Grupo 1 (grupo controle)** - os blocos de osso liofilizado bovino não-desmineralizado (OL) não foram colocados em contato com células, previamente à implantação;
- **Grupo 2** - foram utilizadas células mononucleares obtidas da medula de ossos longos (CMM), conforme protocolo descrito por Meirelles et al.¹⁶, suspensas na concentração de 10⁶ células viáveis por mililitro, e colocadas em contato com os blocos de OL por 24 horas previamente à implantação;
- **Grupo 3** - foram utilizadas células-tronco mesenquimais (CTM) seguindo o protocolo descrito por Meirelles et al.¹⁶, sem indução em meio osteo-

gênico. Conforme demonstrado em estudo prévio¹⁶, as células obtidas por esse processo são células plástico-aderentes capazes de serem expandidas *in vitro* por mais de 50 passagens, podem ser induzidas à diferenciação osteogênica ou adipogênica, e podem suportar o crescimento e a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas – motivos pelos quais são definidas operacionalmente como CTM. Essas células apresentam marcadores de superfície CD44, CD49e, CD29 e Sca-1, e exibem morfologia homogênea e característica¹⁶. As CTM obtidas por esse método foram ressuspensas na concentração de 10⁶ células viáveis por mililitro, e mantidas em contato com os blocos de OL por 24h previamente à implantação.

• **Grupo 4** - foram utilizadas CTM obtidas pelo método descrito acima, ressuspensas na mesma concentração de 10⁶ por mililitro, colocadas em contato com os blocos de OL e em meio osteogênico por 3 semanas (CTMdif). O meio osteogênico utilizado foi constituído do meio normal suplementado com dexametasona, ácido ascórbico e beta-glicerolfosfato, em concentrações descritas abaixo e seguindo o protocolo descrito por Phinney et al.²⁵, modificado por Meirelles et al.¹⁶:

- Meio Normal: meio DMEM + soro fetal bovino (FBS) a 10% + solução tampão HEPES;
- Dexametasona 10⁻⁸ M;
- Ácido ascórbico-2-fosfato - 5µg/ml;
- beta-glicerol fosfato 10 mM;

Procedimento cirúrgico de implantação *in vivo*

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina e xilazina, em condições de assepsia, e em conformidade com as normas do Centro de Pesquisa do HCPA. Cada animal recebeu um implante no plano subcutâneo no dorso, inserido através de incisão no

sentido vertical na linha média do dorso e dissecação romba até a região infra-escapular, sobre o músculo grande dorsal. As incisões foram suturadas com mononylon 4-0. Os animais receberam analgesia nas primeiras 24 horas de pós-operatório, com tramadol injetável.

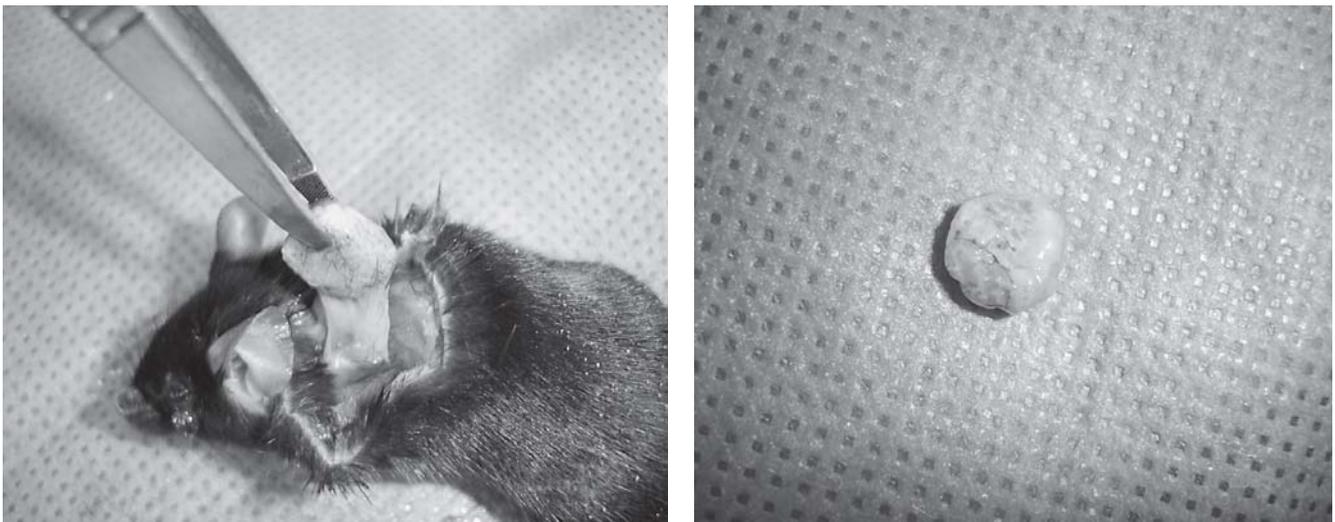
Aferição

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

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

A determinação da atividade de FA foi realizada na Unidade de Pesquisa Biomédica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A FA reflete a atividade osteoblástica, aumentando à proporção do *turnover* ósseo²⁶, e, em estudos de engenharia tecidual óssea, é produzida por osteoblastos e por células-tronco mesenquimais desde o início de sua diferenciação óssea¹⁴, com estreita correlação com outros

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



RESULTADOS

indicadores de diferenciação óssea, como a osteocalcina e a osteopontina^{14,27,28}. Utilizou-se protocolo desenvolvido previamente para a determinação da atividade de FA em construtos ósseos ou materiais de substituição óssea desenvolvidos por engenharia tecidual, apresentado por Portinho et al.²³. Esse protocolo utiliza o kit Sera-Pak Plus®- marca registrada Bayer, baseado em determinação cinética onde a enzima promove o desdobramento do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol, com mensuração espectrofotométrica.

Os valores obtidos nas dosagens bioquímicas de FA foram descritos pela média e desvio-padrão de cada grupo em estudo, e pela análise de variância (ANOVA) de variáveis paramétricas. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS versão 14 e estabeleceu-se previamente um valor $p \leq 0.05$ como significativo.

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

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

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

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

Figura 2 – Cortes histológicos dos construtos ósseos, cinco semanas após a implantação em sítio subcutâneo no dorso. Aumento 50x, coloração HE. A) Grupo 1 - OL controle; B) Grupo 2 - OL + CMM; C) Grupo 3 - OL + CTM; D) Grupo 4 - OL + CTMdif. * trabécula óssea em reabsorção; tecido fibroso com inflamação crônica

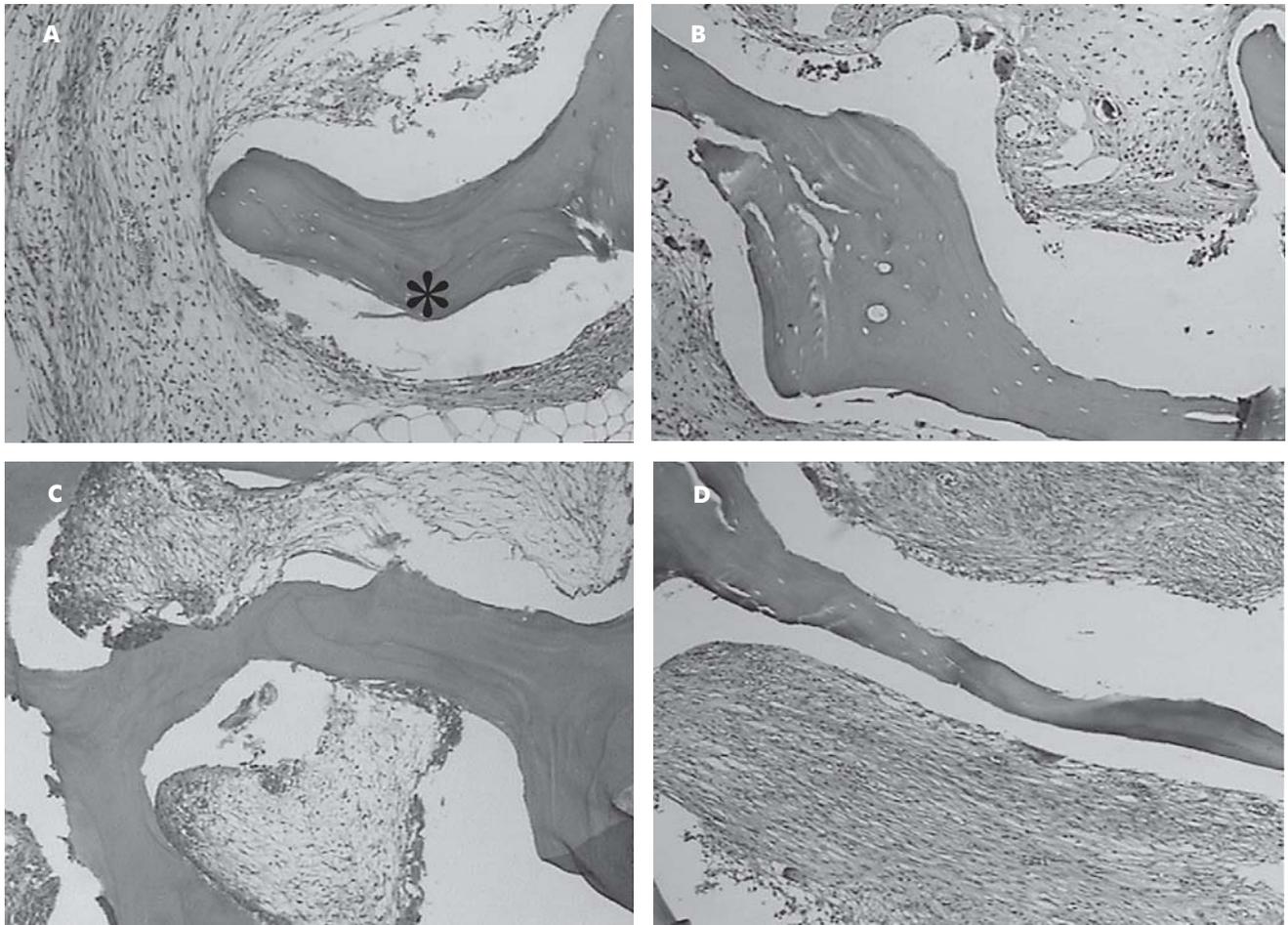


Tabela 1 – Atividade de fosfatase alcalina (FA)

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

ANOVA: $F=0,241$; $p=0,867$ (NS). OL - osso liofilizado bovino não-desmineralizado; CMM - células mononucleares da medula; CTM - células-tronco mesenquimais; CTMdif - células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico.

DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado neste estudo, em sítio heterotópico, portanto livre de estímulos biológicos existentes em locais de perda óssea, é adequado para definir se o material implantado tem propriedades osteoindutivas e osteogênicas, ou apenas osteocondutivas. O sítio subcutâneo no dorso de camundongos ou ratos mostrou-se satisfatório para desenvolvimento de tecido ósseo utilizando células-tronco em carreadores tridimensionais de cerâmica de hidroxiapatita e fosfato de cálcio^{4,14,21,22,27,28}. Da mesma forma, optou-se por um período de seguimento após a implantação de 5 semanas, que tem se mostrado adequado em modelos similares^{22,27,28}.

A opção por estudar o osso liofilizado bovino não-desmineralizado como biomaterial para engenharia tecidual óssea leva em conta as suas qualidades favoráveis para uso clínico, disponibilidade, aceitação no nosso meio, e características de biocompatibilidade e biofuncionalidade em longo prazo^{8,9,24}. A despeito dessas características favoráveis, se contrapõe uma escassez de estudos utilizando esse material como estrutura tridimensional para engenharia tecidual óssea. O osso liofilizado não-desmineralizado é considerado um material osteocondutor, ainda que alguns autores considerem haver propriedades osteoindutivas, dependendo da idade do doador^{10,29}. Consideramos importante estudar se o acréscimo de células-tronco mesenquimais ao osso liofilizado é capaz de atribuir a esse material propriedades osteogênicas.

As células agregadas aos implantes - células mononucleares da medula (CMM), células-tronco mesenquimais (CTM), ou células-tronco mesenquimais diferenciadas em meio osteogênico (CTMdif) - compreendem diferentes fases de separação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, com potencial osteogênico. Considera-se que a frequência de células-tronco mesenquimais entre as células nucleadas da medula óssea é de 1:11.300 a 1:27.000¹⁶. Os métodos utilizados para obtenção de células da medula óssea dos camundongos isogênicos, separação celular, cultura de células-tronco mesenquimais, e sua diferenciação em meio osteogênico têm sido objeto de estudos prévios no Laboratório de Imunogenética da UFRGS, com resultados já publicados¹⁶. O objetivo de comparar células com potencial osteogênico em diferentes fases de separação e diferenciação foi verificar qual método proporcionaria melhores resultados, com menor manipulação *ex vivo* possível.

A adesão das células da medula óssea ou das células-tronco mesenquimais ao material carreador *ex vivo* é uma fase importante para o sucesso da engenharia tecidual óssea. O presente estudo utilizou um método convencional para essa finalidade, em que se promove a suspensão das células no meio de cultura, e a seguir se permite sua sedimentação sobre os construtos. Não há consenso na literatura sobre o método, a quantidade ou o período de exposição das células aos construtos necessários para haver a adesão celular, porém, diferentes autores, em estudos bem-sucedidos de engenharia tecidual óssea com estruturas de cerâmicas de hidroxiapatita ou fosfato tricálcico, utilizam métodos similares ao utilizado neste estudo^{4,14,21,27}. Alguns autores, em estudos que utilizam células-tronco da medula óssea humana sobre estrutura de matriz óssea bovina desengordurada, sugerem resultados superiores quando utilizado um método mais sofisticado para favorecer a infiltração do meio de cultura entre os poros do construto, por meio de centrifugação em um biorreator desenvolvido com essa finalidade⁵. Esses autores denominam o método de “cultivo celular dinâmico” (“*dynamic cell seeding*”), e ressaltam sua importância quando os construtos são grandes, um quesito fundamental para a aplicabilidade clínica⁵. A necessidade de utilizar métodos mais elaborados para promover a adesão celular sobre o material carreador é um dos aspectos metodológicos do presente estudo que pode ser questionado.

A interação entre as células com potencial osteogênico e o material estrutural é um processo reconhecidamente complexo e ainda pouco compreendido²⁰. Além da adesão celular inicial *ex vivo*, é necessária uma interação com a superfície do material que favoreça o crescimento e a diferenciação celular, e posteriormente a deposição de matriz óssea²⁰. Alguns estudos com cerâmicas de hidroxiapatita demonstram que as características microestruturais do material podem influir no sucesso dessa interação^{21,22}. Não existe informação na literatura sobre o processo de adesão e interação de células-tronco mesenquimais à superfície de osso liofilizado não-desmineralizado. O estudo de Mauney et al.⁵ com matrizes ósseas bovinas desengorduradas (não-liofilizadas), desmineralizadas ou não-desmineralizadas, demonstra sucesso na agregação e diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais na fase *ex vivo*, e demonstra sucesso em obter neoformação óssea *in vivo* em 55% dos implantes. Esse estudo sustenta a possibilidade de utilizar matrizes ósseas bovinas como estruturas carreadoras para engenharia tecidual óssea, ainda que os resultados não possam ser generalizados para as matrizes ósseas liofilizadas, como as utilizadas neste estudo.

Além da adequada interação entre células e material, outros aspectos metodológicos também são importantes para obter sucesso na engenharia tecidual óssea: o procedimento cirúrgico de implantação e a integração do construto no sítio receptor representam uma fase crítica nesse processo. Nessa fase, há risco importante de perda de células, mesmo que elas estejam adequadamente agregadas ao construto ósseo *ex vivo*. Sabe-se que, mesmo nos enxertos autólogos, isentos de resposta imunológica, apenas uma pequena fração das células transplantadas irá permanecer viável após a enxertia^{6,30}. O procedimento de enxertia/implantação desencadeia uma resposta que inclui a reação inflamatória ao trauma cirúrgico e a reação imune do hospedeiro ao implante, e a este processo segue-se a migração de células do hospedeiro e o início da neovascularização, resultando na formação de um estroma fibrovascular^{6,30}. Todas as células utilizadas neste estudo, sendo obtidas de animais da mesma linhagem isogênica, podem ser consideradas geneticamente idênticas às células do animal receptor, e, por isso, livres de imunogenicidade. O implante como um todo, por outro lado, contém componentes orgânicos do doador do osso liofilizado (bovino), que não são totalmente eliminados pelo processo de liofilização, e conferem imunogenicidade ao material^{6,30}. Dessa forma, no processo que se segue à implantação, pode-se supor a presença de alterações do microambiente relacionadas à resposta inflamatória e imunológica, bem como à fase inicial de neovascularização, de forma que a celularidade do construto pode ser abalada, mesmo que a agregação celular inicial tenha sido bem sucedida.

Os resultados da avaliação histológica 5 semanas após a implantação *in vivo* mostraram não haver neoformação óssea ou presença de osteoblastos nos implantes, em nenhum dos grupos de comparação. Os resultados da atividade de fosfatase alcalina (FA) mostraram não haver diferença significativa entre os grupos de comparação, com $p=0,867$; e os valores absolutos das mensurações nos 4 grupos de comparação podem ser considerados baixos: 0,959 em média. Dessa forma, a avaliação histológica e a determinação da atividade de fosfatase alcalina FA, com resultados negativos em todos os grupos de comparação, são concordantes, indicando a ausência de osteoblastos nos implantes.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que, no modelo estudado e com os métodos utilizados, a adição de células da medula óssea com potencial osteogênico sobre estrutura de osso liofilizado bovino não-desmineralizado não agregou propriedades osteogênicas ao material. Este estudo não confirmou a perspectiva inicial de utilizá-lo como estrutura tridimensional e carreadora celular na engenharia tecidual óssea, sendo necessários estudos subseqüentes que o avaliem em outros modelos experimentais, e que explorem separadamente cada etapa metodológica que possa influir no sucesso da engenharia tecidual óssea.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Carlos Roberto Galia, Ricardo Rosito e Carlos Alberto Macedo, do Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).
Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

Aos órgãos de apoio à pesquisa que financiaram o projeto: CAPES e FIPE.

REFERÊNCIAS

- DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):859-74.
- Oliveira ACP. Comparação entre enxertos ósseos autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em cranioplastia de ratos [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia;2002.
- Kline Jr RM, Wolfe SA. Complications associated with harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1995;95(1):5-20.
- Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials.* 2005;26(29):5879-89.
- Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Tissue Eng.* 2004;10(1-2):81-92.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop Rel Res.* 2000;371:10-27.
- Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):911-25.
- Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação à resistência do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(9-10):529-34.
- Duarte LS, Schaeffer L. Comparação da resistência à compressão de ossos bovinos congelados e liofilizados. *Rev Bras Eng Biom.* 2000;16(2):89-93.
- Lohmann CH, Andreacchio D, Köster G, Carnes Jr DL, Cochran DL, Dean DD, et al. Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001;121(10):583-90.
- Hulth A, Johnell O, Henricson A. The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin Orthop Rel Res.* 1988;234:235-9.
- Marinak KW, Mellonig JT, Towle HJ. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol.* 1989;60(1):12-8.
- Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;262:298-311.
- Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tami S, et al. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation.* 2000;69(1):128-34.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone.* 1992;13(1):81-8.
- Meirelles LS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-11.
- Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg.* 2001;12(6):586-93.

18. Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K, Kutznetsov S, Hoyt RDVM, Robey PG. Pedicled bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch Surg.* 2001;136(3):263-70.
19. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;262:298-311.
20. Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(8):1027-36.
21. Habibovic P, Yuan H, Valk CM, Meijer G, Blitterswijk CA, Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials.* 2005;26(17):3565-75.
22. Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, et al. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(4):327-36.
23. Portinho CP, Collares MVM, Meirelles L, Silva FH, Pinto RDA, Nardi N, et al. Reconstrução óssea experimental de calota craniana com enxerto de células-tronco mesenquimais [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Pós-Graduação em Medicina;2006.
24. Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [Tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Medicina;2004.
25. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;72(4):570-85.
26. Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft - bone reconstruction using tissue engineering approach. *J Ann Chir Gynaecol.* 1999;88(3):186-92.
27. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata KI, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg.* 2002;13(2):231-9.
28. Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carrier. *Biomaterials.* 2005;26(15):2501-7.
29. Amatuzzi MM, Croci AT, Giovanni AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop.* 2000;35(5):165-72.
30. Leunig M, Demhartner TJ, Sckell A, Fraitzi CR, Gries N, Schenk RK, et al. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. *Acta Orthop Scand.* 1999;70(4):374-80.

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

Artigo recebido: 15/10/2007

Artigo aceito: 10/12/2005