



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



ANDERSON DE OLIVEIRA PAULO

**TERAPIA DE DEFEITO CRÍTICO EM
CRÂNIO DE RATOS PELA ASSOCIAÇÃO
DE XENOENXERTO BOVINO E CÉLULAS
DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO**

ARARAQUARA

2009

ANDERSON DE OLIVEIRA PAULO

**TERAPIA DE DEFEITO CRÍTICO EM
CRÂNIO DE RATOS PELA ASSOCIAÇÃO
DE XENOENXERTO BOVINO E CÉLULAS
DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

ARARAQUARA

2009

Paulo, Anderson de Oliveira

Terapia de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células derivadas de perióstio autógeno / Anderson de Oliveira Paulo . – Araraquara: [s.n.], 2009. 113 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Co-orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

1. Transplante heterólogo 2. Durapatita 3. Colágeno tipo I 4. Perióstio 5. Osteoblastos 6. Células-tronco I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

ANDERSON DE OLIVEIRA PAULO

**TERAPIA DE DEFEITO CRÍTICO EM
CRÂNIO DE RATOS PELA ASSOCIAÇÃO
DE XENOENXERTO BOVINO E CÉLULAS
DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO**

**COMISSÃO JULGADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

Presidente e Orientador:	Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho
2º Examinador:	Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho
3º Examinador:	Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert
4º Examinador:	Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado
5º Examinador:	Prof. Dr. Arlindo Di Spagna Souza

Araraquara, 04 de agosto de 2009

Dados Curriculares

ANDERSON DE OLIVEIRA PAULO

NASCIMENTO 27.09.1965 – VALENÇA – RJ.

FILIAÇÃO Deoclecio Paulo

Olga Marina de Oliveira Paulo.

1984/1988 Curso de Graduação em Odontologia pela
Universidade de Uberaba -UNIUBE.

1996 Aperfeiçoamento em Endodontia pela ABO-DF.

1996/1998 Especialização em Endodontia pelo Hospital
Geral de São Paulo- HGeSP.

2001/2003 Mestrado em Endodontia pelo Centro de
Pesquisas São Leopoldo Mandic - Campinas.

2005 Coordenador do Curso de Graduação em
Odontologia do Instituto de Ensino Superior de
Porto Nacional – TO.

2003/2007 Presidente da Associação Brasileira de
Cirurgiões Dentistas do DF.

2005/2006 Coordenador do Curso de Especialização em
Endodontia do Hospital Geral de Brasília.

2005 Coordenador do Curso de Especialização em
Endodontia da Associação Brasileira de
Cirurgiões Dentistas do DF.

2006 Coordenador do Curso de Especialização em
Endodontia do Centro Superior de Tecnologia
Ensino e pesquisa do Tocantins – CESTEP.

2005/2009 Curso de Doutorado em Endodontia pela
Faculdade de Odontologia de Araraquara-
UNESP.



Dedicatória

Dedico esta tese...

Primeiramente aos meus pais **Deoclécio** e **Olga**, pois foi com vocês que me deram o dom da vida que aprendi o valor da educação, da busca do saber, de colocar em tudo o amor e de persistir sempre independente das dificuldades que se apresentarem. Obrigado pelo amor, dedicação e pelo exemplo de honestidade, seriedade e responsabilidade.

A minha querida esposa **Georgiana**, companheira de jornada em tantas lutas, dificuldades e obstáculos vencidos ou ainda por vencer. Você que é uma mulher forte, inteligente, sensível e de tantas outras qualidades as quais se traduzem no mais importante dos sentimentos, ou seja, no amor.

A meus filhos **Marcela** e **Guto**, em seu olhar aprendo a cada dia o significado do amor desinteressado, puro, verdadeiro e de que como vocês são o que realmente importa. Em vocês está o futuro, em vocês repousa a esperança, em vocês está a continuação de tudo.

A minha irmã **Lisandre**, meu cunhado **Eduardo** e aos meus sobrinhos **André** e **Rafaela**.

ESTA VITÓRIA SEM O AMOR DE VOCÊS NÃO EXISTIRIA

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina



Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao **Criador**, pela vida, pela saúde, por minha família e por guiar meus passos permitindo que eu atingisse mais este objetivo.

Ao **Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado**, um profissional ímpar, que tenho a honra e o privilégio de ter sido meu formador como especialista e mestre. Pela convivência rica em conhecimentos, pelo incentivo e experiência transmitidos, validos tanto para a endodontia como para a vida (sem os quais eu não teria chegado até aqui) e principalmente pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, pela recepção em Araraquara de forma amigável e sincera. Pelos conhecimentos transmitidos de forma clara e precisa. Pela receptividade nas opiniões e por compartilhar sua cultura com humildade e simplicidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, pela presteza, atenção e constante boa vontade. Pela transmissão de conhecimentos. Por concordar com a execução laboratorial desta tese em outra instituição.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**, por me receber no seio de sua competente equipe. Por me mostrar novos horizontes nas áreas de reparo, células-tronco e biomateriais. Pela paciência e simplicidade que reafirmam sua estatura como professor e como um dos maiores pesquisadores brasileiros.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, por todos os ensinamentos compartilhados de forma segura e tranquila. Pela postura séria e discreta, mas sempre amigável. Pelo apoio e compreensão na decisão de realizar esta pesquisa.

Aos professores do curso de doutorado **Profs. Drs. Mário Roberto Leonardo, Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Roberto Miranda Esberard, Marcelo Gonçalves, Izabel Yoko Ito, Maria Helena Matsumoto Komasti Leves e Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pela dedicação conhecimentos transmitidos, convivência e amizade.

Aos colegas com quem convivi na Pós-Graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: **Adriana, Alexandre, Arnaldo, Bier, Cláudia, Cristiane, Eduardo, Erick, Érica, Fabíola, Fernanda, Fernando, Fernandinho, Frank, Fred, Guilherme, Gustavo, Hugo, José Carlos** (mi hermano de México), **Marco Aurélio, Maurício, Melina, Norberto, Paula, Regina, Renata, Renata Morgental, Renatinho** (meu colega de turma), **Ronaldo, Santiago e Sérgio**, pela troca de experiências, ansiedades compartilhadas que moldaram e solidificaram nossa amizade.

Ao **Prof. Igor Iuco**, pela atenção, paciência, boa vontade e principalmente pelos conhecimentos transmitidos de forma amigável sem reservas ou melindres. Um grande pesquisador.

À minha grande amiga (prima) **Silvia de Azevedo Paulo**, por todo o apoio, ajuda e orientação sem os quais esta tese não teria sido realizada.

Ao **Prof. Dr. Arlindo Di Spagna Souza**, pela amizade incondicional, apoio, experiência, ensinamentos e calma sempre transmitidos mesmo que a distância.

Ao meu querido amigo **Giancarlo**, pela amizade e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Raul Capp Palotta** e ao **Prof. Helder Massaro** pela experiência, amizade e força.

À amiga **Denise Falcão**, pelo exemplo de competência, seriedade e dedicação. Conseguindo mesclar tudo isso com a amizade.

Às queridas amigas **Ângela Maria Silva** e **Carollynne Mota Tiago**, pela amizade constante e apoio incondicional.

Aos companheiros e amigos **Henrique Torres** e **Wilker Silva**, pelo apoio, amizade e fiel parceria.

A **Sra. Mara** da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, por toda a atenção, educação, respeito, boa vontade e amizade.

A **Sra. Simone Amaral**, pelo apoio a execução desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: **Célia, Creusa, Pedro, Adriana, Cida** e **Conceição**, pelo convívio, amizade e atenção.

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP**, pela oportunidade de realizar este curso de doutorado em uma instituição tão séria e conceituada.

A **Universidade Federal Fluminense**, pela realização de todos os procedimentos laboratoriais desta pesquisa.

A **todos que de maneira direta ou indireta** contribuíram para a conclusão desta Tese.

A MINHA GRATIDÃO

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência: ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, nada serei.”

Paulo de Tarso

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE GRÁFICOS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	20
REVISÃO DA LITERATURA	26
PROPOSIÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODO	53
RESULTADO	68
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	PRÉ-ANESTESIA DO ANIMAL COM ÉTER (A), APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE 60 MG/KG DE KETAMINA E 12 MG/KG DE XILAZINA(B)	54
FIGURA 2 -	TRICOTOMIA, INCISÃO, DEMARCAÇÃO DO TECIDO COLETADO, REMOÇÃO DO PERIÓSTEO E SUTURA NOS <i>RATTUS NORVEGICUS ALBINUS</i>	55
FIGURA 3 -	TRANSPORTE DA BIOPSIA EM TUBOS DE CENTRÍFUGA CONTENDO DMEM:HAM F12	55
FIGURA 4 -	A BIOPSIA SENDO TRABALHADA EM FLUXO LAMINAR NO QUAL FOI LAVADA EM PBS, SOFREU DIGESTÃO ENZIMÁTICA E CLIVAGEM	56
FIGURA 5 -	APÓS A DIGESTÃO ENZIMÁTICA E CLIVAGEM O MATERIAL FOI CENTRIFUGADO E OBSERVADO AO MICROSCÓPIO INVERTIDO	56
FIGURA 6 -	A CONTAGEM CELULAR NA CÂMARA DE NEUBAUER, A INCUBAÇÃO EM CONTAINERS PLÁSTICOS NA ESTUFA .	57
FIGURA 7 -	O ESPECTROFOTÔMETRO(A) E UM NÓDULO DE MINERALIZAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE VON KOSSA(B)	59
FIGURA 8 -	CÉLULAS DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO (CDPA, 400X). INCUBAÇÃO DO CONJUNTO CDPA+HA/COL (B)	60
FIGURA 9 -	CRANIOTOMIA REALIZADA COM A TREFINA DE 8 mm CONFECCIONANDO O DEFEITO CRÍTICO	61
FIGURA 10 -	DEFEITO ÓSSEO DE TAMANHO CRÍTICO (DIÂMETRO=8 mm), PREENCHIDO POR COÁGULO SANGUÍNEO (A), OSSO AUTÓGENO PARTICULADO (B), XENOENXERTO ACELULAR (C) OU XENOENXERTO ASSOCIADO A CÉLULAS DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO (D)	62
FIGURA 11 -	ÁREA DA NECROPSIA DELIMITADA E MICROMOTOR COM DISCO DE CARBURUNDUM PARA O CORTE DA PEÇA	63
FIGURA 12 -	RADIOGRAFIA DIGITAL - IMAGE PLATE: IPX (GE IT) TUBO DE RAIOS X: FXS-100.10 (FEINFOCUS)	64
FIGURA 13 -	SCANNER COM A IMAGEM RADIOGRÁFICA DIGITALIZADA DA BIOPSIA	64

FIGURA 14 -	PROCESSAMENTO	HISTOLÓPATOLÓGICO	65
FIGURA 15 -	O PROGRAMA IMAGE PRO-PLUS 6.0 COM A IMAGEM DOS CAMPOS CONTÍGUOS DA LÂMINA (170 X) COM A SUPERPOSIÇÃO DE UMA GRADE COM 100 PONTOS		67
FIGURA 16 -	RESULTADOS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA MOSTRANDO: O CÁLCIO SOBRENADANTE, O CÁLCIO PRECIPITADO A ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA E PROTEÍNAS	TOTAIS	70
FIGURA 17 -	NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO (VON KOSSA) COM 21 DIAS (A) E 28 DIAS(B)		70
FIGURA 18 -	ÁREAS CONFLUENTES (MATERIAL RECOBERTO COM CDPA), ÁREAS NÃO CONFLUENTES (MATERIAL NÃO RECOBERTO COM CDPA)		71
FIGURA 19 -	ANÁLISE RADIOGRÁFICA. 1 MÊS: GRUPO 1 (A), GRUPO 2 (B), GRUPO 3 (C) E GRUPO 4 (D). 3 MESES: GRUPO 1 (E), GRUPO 2 (F), GRUPO 3 (G) E GRUPO 4 (H)		72
FIGURA 20 -	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, EM 1 MÊS (A-G1, B-G2, C-G3 E D-G4) E 3 MESES (E-G1, F-G2, G-G3 E H-G4). TECIDO CONJUNTIVO (ASTERISCO), OSSO NEOFORMADO (SETA PRETA OU ON), OSSO ANTIGO (AO), LINHA DE REVERSÃO (SETA FINA), VASOS SANGUÍNEOS (CABEÇA DE SETA BRANCA), BIOMATERIAL (B), ÁREAS DE OSSIFICAÇÃO (TRACEJADO). COLORAÇÃO: HEMATOXILINA-EOSINA, AUMENTO: 170X		74
FIGURA 21 -	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA. GRÁFICOS COM A DENSIDADE MÉDIA DE VOLUME E DESVIO-PADRÃO DE ACORDO COM OS GRUPOS E OS TEMPOS EXPERIMENTAIS: OSSO NOVO (B), TECIDO CONJUNTIVO NOVO (C), PRESENÇA DE VASOS SAGUÍNEOS (D) E BIOMATERIAL ENXERTADO (E)		76

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: OSSO NOVO, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$	77
GRÁFICO 2 -	ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: TECIDO CONJUNTIVO NOVO, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$	77
GRÁFICO 3 -	ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO OS GRUPOS E O TEMPO EXPERIMENTAL: PRESENÇA DE VASOS SANGUÍNEOS, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$	78
GRÁFICO 4 -	ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: BIOMATERIAL ENXERTADO, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$	78

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF:	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BMP:	Proteína óssea morfogenética
BSP:	Sialoproteína óssea
°C:	Graus Celsius
cbfa 1:	
CDPA:	Células derivadas de perióstio autógeno
CGMCE:	Células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho
cm:	Centímetro
cm ² :	Centímetro quadrado
D:	Diluição da amostra
DAG:	Dexametazona + Ácido ascórbico + β-Glicerofosfato
DEX:	Dexametazona
DMEM:HAMF12:	Meio de Eagle modificado por Dubelco
HA/CoL:	xenoinxerto de hidroxiapatita e colágeno tipo I
HE:	Hematoxilina-Eosina
M:	Molar
mA:	Miliampere
mL:	Mililitro
NC:	Número de células viáveis contadas
PBS:	Tampão fosfato em solução alcalina
PRP:	Plasma rico em plaquetas
RPM:	Rotações por minuto
TPP:	Container plástico de 25 cm ²
µm:	Micrômetro



Resumo

Paulo AO. Terapia de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células derivadas de periósteo autógeno [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação de células derivadas de periósteo autógeno (CDPA) e xenoenxerto de hidroxiapatita e colágeno I (HA/Col) no reparo de defeito crítico de crânio de ratos. CDPA de 10 ratos Wistar foram semeadas na densidade de $1,0 \times 10^6$ células sobre discos de HA/Col (8x2mm) em DMEM:HAMF12 com 10% soro fetal bovino e dexametazona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato por 6 dias. Ensaio funcional comparou efeito de coágulo sanguíneo (G1), osso autógeno (G2), HA/Col (G3) e HA/Col+CDPA (G4) preenchendo defeito de 8 mm de crânio de ratos (n=40) em 1 e 3 meses. A análise radiográfica não exibiu variação temporal, tendo G1 e G2 discreto novo osso marginal; radiopacidade dos materiais em G2, G3 e G4 impediu confirmar osteogênese central. A análise histológica dos grupos mostrou em G1 tecido conjuntivo denso e ilhas de ossificação (1-3m), em G2 coalescência do material e osteogênese (1-3m), em G3 ossificação intramembranosa (1m) e novo osso homogêneo ao redor e substituindo HA (3m) e em G4 abundante tecido conjuntivo frouxo permeando material (1m) e novo osso heterogêneo (3m); não houve necrose, inflamação crônica ou exuberância de células gigantes tipo corpo estranho. As análises histomorfométrica e estatística mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) para biomaterial (1m) de G2 (23,3%) com G3 (44,6%) e G4 (47,5%) e para ganho ósseo (3m) de G2 (10,9%) com G1 (4,6%) e G4 (5,1%), tendo G3 (8,5%) neoformação óssea próxima a G2. Conclui-se que CDPA não aumentam formação óssea se associadas a HA/Col.

Palavras-chave: Transplante heterólogo; Durapatita; Colágeno tipo I; Periósteo; Osteoblastos; Células-tronco.



Abstract

Paulo AO. Therapy for critical defect in rat calvaria by the association of veal xenograft and cells derived from periosteum autogenous [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the association of autogenous periosteum derived cells (APDC) and xenograft made up hydroxyapatite and collagen I (HA/Col) in repair of critical size defect in rat calvaria. APDC of 10 Wistar rats were seeded with density of $1,0 \times 10^6$ cells above discs of HA/Col (8x2mm) in DMEM:HAMF12 with 10% fetal bovine serum and dexamethasone, ascorbic acid and β -glicerophosphate until 6 days. Functional assay compared effect of blood clot (G1), autogenous bone (G2), HA/Col (G3) and HA/Col+CDPA (G4) filling the 8mm-defect in rat skull (n=40) at 1 and 3 months. Radiographic analysis didn't have time variation, with G1 and G2 showing mild peripheral new bone; radiopacity of materials in G2, G3 and G4 didn't enable to confirm central osteogenesis. Histologic analysis of groups showed in G1 dense connective tissue and bone islets (1-3m), in G2 fusion of material and osteogenesis (1-3m), in G3 intramembranous ossification (1m) and homogeneous new bone around and substitute HA (3m) and in G4 abundant loose connective tissue permeating the material (1m) and heterogeneous new bone (3m); there is not necrosis, chronic inflammation or exuberance of giant cell like foreign body reaction. Histomorphometric and statistic analysis showed significative differences ($p < 0.05$) for biomaterial (1m) from G2 (23,3%) to G3 (44,6%) and G4 (47,5%) and for bone gain (3m) from G2 (10,9%) to G1 (4,6%) and G4 (5,1%), with G3 (8,5%) showing new bone formation closer to G2. It's possible to conclude that APDC don't increase bone formation if associate to HA/Col.

Keywords: Transplantation heterologous; Durapatite; Collagen Type I; Periosteum; Osteoblasts; Stem Cells.



Introdução

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo altamente vascularizado, tem basicamente as funções de sustentação, proteção dos órgãos internos e locomoção. Os osteoblastos que são fibroblastos “sofisticados” como afirmaram Ducey et al.³³ (2000), são as células responsáveis pela formação da matriz orgânica dos ossos e tem ação também na sua mineralização⁶³, estão dispostos em uma camada aderida sob a superfície óssea tem uma forma cuboidal, com núcleos predominantemente arredondados⁷⁵. Os osteoblastos podem ser detectados pela identificação da osteocalcina por meio da imunomarcção^{53,55} ou da PCR²⁵. Segundo Nefussi et al.⁸⁵ (1997), muitos sistemas, incluindo células de calvária, células de endóstio e células medulares estromais mostram formação de nódulos ósseos in vitro. A direção do crescimento do osso é sempre perpendicular à base dos osteoblastos⁹³. A formação de osso depende da migração de uma população de células potencialmente osteogênicas, e da diferenciação desta população em células secretórias maduras³⁰.

Em 1963, Urist, Mclean¹²⁰ estabeleceram que a razão da osteogênese ou formação de novo osso deve ser superior a razão de invasão de tecido fibroso durante reparo de lesões endocondrais.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 150 doenças e síndromes relacionadas a problemas esqueléticos e articulares¹⁵.

Embora haja grande progresso no desenvolvimento de substitutos ósseos, ainda não existe o biomaterial ideal que mimetize as propriedades e características de células viáveis especializadas em produzir este tecido. Dessa forma, a

bioengenharia tecidual surge como uma ferramenta capaz de utilizar células isoladas, fatores de crescimento que induzem proliferação celular (como proteínas ósseas morfogenéticas) e substratos adequados que agem como carreadores de células ou proteínas, objetivando criar tecidos autógenos em laboratório e possibilitar sua aplicação como agentes terapêuticos^{24,45,49,71,86,117}.

Os significativos avanços em técnicas de biologia celular e molecular permitiram obter células precursoras de osteoblastos (células-tronco mesenquimais e células osteoprogenitoras) e diferenciá-las em osteoblasto, sendo isoladas de uma grande variedade de tecidos^{26,57,61,65,77,95,104,105} como medula óssea de crista ilíaca^{31,64,82}, tíbia e fêmur⁸⁹, espinha torácica e lombar²⁹, osso trabecular^{11,22}, tecido adiposo¹²², tecido muscular, sinóvia¹²⁵, polpa dental de dentes decíduos⁸⁴ ou permanentes⁶⁹, papila dental⁵³, sangue periférico⁴³, derme⁷², placenta⁴², sangue^{14,23,101} ou parede de cordão umbilical⁹⁸ e perióstio^{10,58,107,112,115,119,124,128}.

Segundo Akita et al.³ (2004) e Kim et al.⁶⁵ (2003), as citocinas podem influenciar o grau de indução osteogênica in vitro de células tronco mesenquimais e o padrão de reparo ósseo in vivo.

A severidade de um trauma ósseo e o gênero podem afetar a capacidade proliferativa (ou densidade celular) e de reserva de células-tronco mesenquimais de medula óssea. Em termos de densidade celular, o sexo masculino teve maior representatividade nas médias dos indivíduos saudáveis, desuniões atróficas enquanto as mulheres obtiveram melhor quantificação em monofraturas e múltiplos traumas. Isso sugere que o trauma estimula a mobilização, replicação e diferenciação dessas células, sendo sua frequência média aumentada em pacientes com múltiplas injúrias (sexo feminino) e diminuída em casos de desunião atrófica (mulheres/homens) e monofraturas (homens)¹⁰⁹.

A inserção das células-tronco mesenquimais ou osteoprogenitoras podem ser por via sistêmica ou tópica. A forma sistêmica não requer a presença de materiais carreadores, pois se baseia na infusão sanguínea^{20,51} ou percutânea¹¹⁵.

Particularmente, um grande número de pesquisas têm investigado o potencial de células derivadas de periósteo na diferenciação em células osteogênicas, representando uma interessante fonte alternativa à medula óssea nos últimos 10 anos^{19,35,52,56,60,82,90,103,127}. A engenharia tecidual usando células de periósteo teria como grande vantagem a necessidade de pequenas quantidades de tecido do paciente obtidas por meio de técnicas pouco invasivas e mais seguras do que os métodos convencionais. Poderia ser usada por dentistas como terapia regenerativa de osso alveolar, indicada em casos de periodontites e implantes dentais, devido a sua fácil manipulação, expansão em laboratório e reimplante em fase de mineralização inicial no próprio paciente, sendo mais fácil coletar células do periósteo mandibular durante uma cirurgia oral de rotina do que de aspirado de medula óssea^{2,108}. Em relação ao potencial osteogênico, células derivadas de periósteo têm taxa de proliferação maior que células estromais medulares, refletindo este menor tempo de cultura celular em menor custo e risco de contaminação, apesar destas células apresentarem menos marcadores osteogênicos (como fosfatase alcalina e nódulos de mineralização) do que as células de medula óssea^{2,56}. Contudo, apesar do periósteo representar uma fonte viável para células osteoprogenitoras, falta um biomaterial que reúna as características adequadas para atuar como um carreador na bioengenharia óssea.

Materiais de enxerto podem se classificar quanto a origem e a composição. Quanto a origem, pertencem a uma das quatro categorias: autógenos^{17,76,87}, alógenos, xenógenos ou aloplásticos; matrizes xenógenas de origem bovina mostraram-se biocompatíveis em diversos modelos biológicos, como o rato^{80,111}. Os xenoenxertos podem conter colágeno ou hidroxiapatita, bem

como a combinação de ambos^{97,123}. O colágeno é biodegradável e permite adesão, crescimento e diferenciação celular^{13,107}. A apatita natural é osteocondutora^{13,106,119} e tem se mostrado osteoindutora em alguns modelos in vivo^{46,47,96,126}. Vidal¹²¹ (1996) inicialmente testou o compósito natural formulado com 75% de hidroxiapatita e 25% de colágeno tipo I, de origem xenógena, observando no período de 57 dias em ratos na região suprapariosteal do crânio e em pequenos defeitos ósseos circulares em fêmur (diâmetro: 1-2mm), formação de osteóide e/ou osso imaturo circular aos grânulos de hidroxiapatita. Em design funcional^{18,21,27,28,34,37,50,59}, comprovaram que o mesmo material preenchendo defeito ósseo crítico em crânio de ratos isoladamente mostrou-se biocompatível, osteocondutor e parcialmente biodegradável⁶ no período de 3 meses.

Nos últimos anos, o cultivo de células tem sido feito em arcabouços, de forma a mimetizar a estrutura tridimensional do tecido ósseo¹. Os osteoblastos criam um micro-ambiente suficiente para preservar a competência osteogênica, atingindo a completa maturação com depósito de matriz extracelular, mantendo interações recíprocas e adaptativas célula-célula e célula-matriz extracelular³⁹. O estudo pioneiro de Sakata et al.¹⁰³ (2006), enxertando células de perióstio mandibular humano carregadas por uma esponja colágena tridimensional em defeito ósseo de tamanho crítico em calvária de rato imunossuprimido, demonstrou em 5 semanas significativo crescimento ósseo central se comparado ao controle. Hayashi et al.⁴⁸ (2008) mostraram que a associação de células derivadas de perióstio alógeno (de diáfises de fêmur e tíbia) e hidroxiapatita implantada no tecido subcutâneo de ratos gera osso ectópico no período de 6 semanas. Rodrigues et al.⁹⁷ (2003) acrescentaram um dado favorável no campo da bioengenharia tecidual: compósito de hidroxiapatita e colágeno I testado apresenta adesão e espraiamento de osteoblastos humanos dentro de 11 dias em cultura celular.

A literatura é escassa no estudo in vivo da associação de células derivadas de periósteo a um carreador compósito (hidroxiapatita e colágeno); como já descritos, cada componente desta associação teria propriedades favoráveis à formação óssea, o que justifica mais pesquisas no campo da bioengenharia tecidual. Por este motivo, procurou-se avaliar funcionalmente esta associação com potencial benéfico ao tratamento de perdas ósseas extensas.



Revisão da literatura

REVISÃO DA LITERATURA

FORMAÇÃO E ESTRUTURA ÓSSEA - OSTEOLASTOS

As células responsáveis pela síntese e secreção de matriz orgânica do osso são os osteoblastos. Os osteoblastos formam também as vesículas da matriz que são associadas à enzima fosfatase alcalina, fundamental na mineralização óssea⁶³. Os osteoblastos estão dispostos em uma camada aderida sob a superfície óssea tem uma forma cuboidal, com núcleos predominantemente arredondados⁷⁵.

Em cultura, os osteoblastos podem ser muito semelhantes aos fibroblastos a não ser pelo fato de que estes não são capazes de produzir uma matriz extracelular mineralizada. Entretanto, não existem evidências até o momento de que a mineralização da matriz seja determinada por genes expressos somente por osteoblastos. Geneticamente podemos considerar os osteoblastos como fibroblastos especializados, já que quase todos os genes expressos nos osteoblastos são também expressos em fibroblastos. Somente dois fatores são transcritos especificamente em osteoblastos: Cbfa1 (fator de transcrição indutor de osteoblastos), expressos em níveis de 10 a 100 vezes mais altos em osteoblastos do que em qualquer outro tipo celular, e osteocalcina (marcador específico de osteoblastos maduros). O Cbfa1 possui um papel crítico na diferenciação de linhagens osteogênicas. Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de Cbfa1 precede a diferenciação dos osteoblastos e é restrita às células mesenquimais destinadas a serem condrócitos ou osteoblastos. A formação óssea está implicada diretamente ou indiretamente em crescimento ósseo longitudinal, mineralização óssea e remodelação óssea, todas as funções que não são facilmente estudadas in vitro. Dessa forma, a compreensão do

controle molecular da função de osteoblastos tem sido significativamente baseada em tecnologia de deleção de genes³³.

A deposição da matriz extracelular é uma importante etapa na formação de todos os tecidos rígidos e órgãos. Os osteoblastos não só são responsáveis pela deposição da matriz óssea, como também regulam a diferenciação dos osteoclastos e a sua atividade no processo de reabsorção óssea, o que remete a essas células um papel importante, mesmo que por vias indiretas, na regulação de homeostasia do cálcio^{33,75}.

In vivo, a deposição da matriz é um processo altamente direcionado que requer que os osteoblastos façam a distinção entre a membrana ligada por contato (junções) e a membrana livre, com o objetivo de direcionar o fluxo de vesículas para uma determinada região. Por serem células polarizadas, os osteoblastos secretam as proteínas que vão constituir a matriz (osteóide), de forma perpendicular à base da célula, longe dos capilares e em direção à superfície óssea já existente. Sendo assim, a direção do crescimento do osso é sempre perpendicular à base dos osteoblastos⁹³. Os osteoprogenitores dos osteoblastos derivam das células mesenquimais pluripotentes, que por sua vez dão origem a progenitores de outras linhagens de células como fibroblastos, mioblastos, adipócitos e condrócitos^{4,61}.

O desenvolvimento ósseo pode ocorrer através de dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa é responsável pela formação dos ossos da calota craniana como o frontal, o parietal, parte do occipital e as partes escamosas e timpânicas do osso temporal. Através deste processo se originam também, a maxila, a mandíbula e a clavícula. A ossificação intramembranosa também contribui para o aumento em espessura dos ossos longos e para o crescimento dos ossos curtos⁶³.

O início da ossificação intramembranosa ocorre com a ativação das células mesenquimais que proliferam e se agrupam na presença de uma abundante rede de capilares. Em seguida

estas células se diferenciam em osteoblastos que passam a sintetizar e secretar as moléculas constituintes da matriz orgânica (osteóide), que é posteriormente mineralizada. A deposição dos componentes da matriz orgânica e a sua subsequente mineralização acarretam o aprisionamento dos osteoblastos dentro desta matriz calcificada e, nesta condição, se diferenciam em osteócitos⁷⁵.

O entrelaçamento de vários centros de ossificação intramembranosa resulta na formação das trabéculas ou traves ósseas e entre elas, amplas cavidades abrigam numerosos vasos sanguíneos. Dessa forma, origina-se o osso primário, que com o aparecimento dos osteoclastos é gradualmente substituído pelo osso maduro ou lamelar⁶³.

O processo de ossificação endocondral é responsável pela formação dos ossos longos das extremidades, bem como das vértebras e costelas. Neste tipo de ossificação as células mesenquimais proliferam, condensam e se diferenciam em condroblastos. A partir daí, um esboço cartilaginoso é inicialmente formado, na região e na forma do futuro osso. Na superfície da região mediana do modelo cartilaginoso, células mesenquimais adjacentes ao pericôndrio se diferenciam em osteoblastos. Estes passam a sintetizar e secretar matriz orgânica óssea que em seguida é mineralizada, formando externamente ao pericôndrio do modelo cartilaginoso um anel ósseo, que restringe a passagem de nutrientes para os condrócitos na parte mais interna da cartilagem. A seguir, os condrócitos sofrem alterações e começam a hipertrofiar⁷⁵. Durante esse processo os condrócitos produzem vesículas da matriz que promovem a sua mineralização, com subsequente morte das células por apoptose, restando apenas as cavidades entre os tabiques da matriz cartilaginosa calcificada. A persistência da matriz mineralizada mesmo após a morte e desaparecimento dos condrócitos, serve de suporte para a deposição do osso subcondral. As cavidades deixadas pelos condrócitos entre os tabiques de matriz cartilaginosa calcificada

são invadidas por capilares e células indiferenciadas vindas do mesênquima adjacente. Estas células se diferenciam em osteoblastos, que passam a sintetizar e secretar a matriz orgânica óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, que servem apenas de ponto de apoio para a ossificação. Essa matriz é posteriormente mineralizada, dando origem ao tecido ósseo onde, anteriormente, havia tecido cartilaginoso⁷⁹.

Segundo Akita et al.³ (2004), a presença de citocinas pode influenciar o grau de indução osteogênica in vitro de células tronco mesenquimais e o padrão de reparo ósseo in vivo em modelo de defeito crítico craniano. Através da aplicação de bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) (2,5 ng/mL) e BMP-2 (50 ng/mL) além do meio suplementado osteogênico, observou-se em cultura expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina, e em defeito craniano tratado com esponja colágena acrescida de 10µg de BMP-2 e bFGF, que produziu osteócitos maduros circundados por osteoblastos e osteoclastos. Expressando fosfatase alcalina e osteocalcina, com maior imunoreatividade observada nos espaços intersticiais do carreador colágeno, acelerando o padrão de reparo ósseo.

O mecanismo pelo qual o osso é formado a partir de células previamente não diferenciadas, seja na recuperação de uma fratura, na recuperação do tecido em torno de um implante ou na remodelação, é semelhante. A formação de osso depende da migração de uma população de células potencialmente osteogênicas, e da diferenciação desta população em células secretórias maduras. Tanto na remodelação endosteal como na cortical, isto envolve a migração através de uma matriz de tecido conjuntivo primitivo, células perivasculares, endosteais, ou células da camada interna do periósteo para a superfície da região reabsorvida. Da mesma forma, na fratura e recuperação peri-implante, a população potencialmente osteogênica vai migrar através do coágulo assumindo a retenção do mesmo, e vai atingir a superfície dos fragmentos de osso ou implante, dentro do local da

lesão. Em cada um destes casos, as células que atingem a superfície sólida do tecido ósseo velho ou do implante, vão iniciar a síntese de matriz nessas superfícies. As células que se diferenciam antes de atingir a superfície do alvo vão secretar matriz. Como consequência, elas irão parar de migrar e, portanto, não atingirão a superfície do alvo. Dessa forma, a osteocondução vai resultar em uma espícula óssea avançando na direção da superfície do alvo. Por outro lado, os osteoblastos diferenciados, ativos na secreção, irão se afastar da superfície em consequência da diferenciação precoce, ou ficar presos como osteócitos na matriz que eles produziram³⁰.

É a taxa de síntese da matriz recém-formada que produz as diferenças significativas na aparência do osso lamelar e esponjoso. O osso lamelar é o resultado de secreção lenta e sincronizada, enquanto o osso esponjoso é o resultado de secreção rápida e não sincronizada. Aparentemente a estrutura e a composição do osso formado in vitro mimetizam o osso esponjoso. Isto é particularmente significativo para aqueles interessados em estratégias de engenharia de tecidos baseadas em estágio de formação de matriz de tecido ósseo in vitro. Mesmo nas estratégias de engenharia de tecidos, nas quais as células-tronco ou osteoprogenitoras são semeadas sobre ou dentro de um arcabouço que é implantado imediatamente, a primeira matriz de osso formada dentro do arcabouço será de osso esponjoso, o qual será substituído durante remodelação de longo termo. De fato, na remodelação óssea, seja do osso esponjoso ou lamelar, um novo osso se forma sobre a superfície sólida resultante da absorção óssea. Este novo osso tem características particulares e a sua formação é denominada de novo, resultante da atividade de células osteogênicas em recente estado de diferenciação³⁰.

TRATAMENTO DE PERDAS ÓSSEAS SEVERAS E/OU CRÍTICAS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 150 doenças e síndromes relacionadas a problemas esqueléticos e articulares¹⁵.

O tecido ósseo possui alta capacidade de regeneração espontânea, porém este potencial é limitado pelo tamanho do defeito. Nos últimos anos, vários procedimentos cirúrgicos usando substitutos ósseos biológicos ou sintéticos têm sido desenvolvidos para o tratamento destes defeitos no intuito de promover seu fechamento com novo tecido ósseo que possua características morfológicas e funcionais similares ao tecido original^{80,87}.

Segundo Schmitz, Hollinger¹⁰⁸ (1986), a quantidade de reparo que ocorre no defeito ósseo é dependente do tamanho da ferida. Um defeito crítico pode ser definido como o menor tamanho de ferida intra-óssea em um osso particular ou espécie animal que não cicatrizará espontaneamente durante o tempo de vida do animal. A patogênese dos defeitos ósseos de tamanho crítico envolvem 2 mecanismos: a) formação de uma barreira fibroblástica pelo perióstio ou segundo Dahlin et al.²⁸ (1991), prolapso de tecido mole dentro do defeito com fusão de dura e pericrânio, devido a rápida migração de fibroblastos, prevenindo a união das margens ósseas, ou b) incapacidade do hematoma no momento de injúria em se organizar e fechar a fenda grande, levando a ausência de outros elementos osteogênicos e fazendo reparo incompleto.

A qualidade do reparo ósseo sob condições experimentais ótimas (defeitos estáveis e não-infectados) pode ser influenciada marcadamente por cinco variáveis: (1) espécies animais, (2) idade do animal, (3) localização anatômica do defeito experimental, (4) tamanho do defeito e (5) perióstio intacto^{44,64}.

Segundo Schimitz, Hollinger¹⁰⁸ (1986), o modelo de defeito crítico em calvária tem muitas similaridades a região maxilofacial, sendo um sítio freqüente para teste de materiais de reparo ósseo. O crânio, quando comparado a outros ossos, possui pobre suprimento sangüíneo e a relativa deficiência de medula óssea, fisiologicamente lembrando uma mandíbula atrófica. Morfológica e embriologicamente, a calvária desenvolve-se de uma membrana precursora e então lembra ossos membranosos da face¹⁰⁸. Em 1963, Urist, McLean¹²⁰ estabeleceram que a razão da osteogênese ou formação de novo osso deve ser superior a razão de invasão de tecido fibroso durante reparo de lesões endocondrais. Aparentemente, este princípio se aplica também ao osso intramembranoso. Oklund et al.⁸⁷ (1986) mostra que o recrutamento de células perivasculares do estroma da medula óssea e o endóstio podem direcionar de forma eficiente o crescimento ósseo das bordas para completa regeneração óssea no animal adulto.

Takagi, Urist¹¹⁴ (1982) mostraram que defeitos de 8 mm de diâmetro criados em calvária de ratos Sprague-Dawley velhos não repararam espontaneamente em 12 semanas, sendo observada uma formação óssea inferior a 50% do defeito, por técnicas radiográfica e histopatológica. Essa formação óssea diminuta ocorreu principalmente nas margens do defeito de calvária, mas se observou também na camada mais profunda da dura-máter em forma de ilhas de novo osso. Ratos em desmame formam um modelo animal não-satisfatório para avaliar materiais de reparo ósseo devido a sua grande capacidade de reparar espontaneamente defeitos grandes.

Honma et al.⁵⁰ (2008), pesquisaram o mecanismo biológico que regula o processo de reparação óssea do defeito de tamanho crítico permanece desconhecido. O presente estudo foi desenhado para investigar a reparação óssea, em um defeito de tamanho crítico em comparação com a de um menor ou não-crítico. Os defeitos em calvárias de rato foram utilizados como modelo para

o experimento. A taxa de formação óssea foi analisada com raios-X e morfometria óssea a produção de osteoblastos e osteócitos foi avaliada por histologia molecular com a hibridização in situ para o colágeno tipo I e osteocalcina. Formação de reparação óssea por 24 semanas, independentemente da conclusão do reparo do defeito. Os resultados sugerem que osteoblastos e osteócitos cessam a formação óssea, bem como a diferenciação dos osteoblastos progenitores declina em 24 semanas. Além disso, a reparação óssea procede do periósteo, em ambos os lados do osso parietal, mas não a partir da superfície do rebordo ósseo ao redor do defeito original. Os resultados poderão fornecer informações úteis para a investigação clínica na reparação óssea.

O declínio de formação óssea bem como a finalização da diferenciação dos osteoblastos é explicado pela senescência que é a paralisação irreversível da duplicação celular pelo encurtamento dos telômeros restringindo por consequência a reparação tecidual^{31,110}.

Materiais de enxerto podem se classificar quanto a origem e a composição. Quanto a origem, pertencem a uma das quatro categorias: autógenos^{17,76,87}, alógenos, xenógenos ou aloplásticos; matrizes xenógenas de origem bovina mostraram-se biocompatíveis em diversos modelos biológicos, como o rato^{80,111}. Nos últimos anos, o cultivo de células tem sido feito em arcabouços (scaffolds), de diferentes origens, de forma a mimetizar a estrutura tridimensional do tecido ósseo^{1,100}.

Autógenos são materiais tirados do hospedeiro e são o único tipo de material de enxerto que possui habilidades osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva, sendo então considerados o “padrão ouro” para regeneração de estruturas ósseas. Como ratifica Oklund et al.⁸⁷ (1986) e Oliveira et al.⁸⁸ (2008) o osso trabecular fresco autógeno é superior a todos os tipos de osso autógeno processado ou osso alógeno fresco ou processado. Seja como for, seu uso é limitado pela necessidade de um segundo sítio cirúrgico para coletar o osso, possíveis

complicações pós-operatórias relacionadas ao procedimento de coleta (morbidade, incluindo infecção, malformação, dor e perda de função) e campo limitado em algumas situações (quantidade insuficiente)¹⁷.

Os materiais alógenos são tirados de outro indivíduo da mesma espécie com diferentes genótipos, como cadáveres, parentes ou bancos ósseos. Para a preparação como enxerto, são muitas vezes simplesmente congelados, congelados a seco, irradiados ou desmineralizados. O congelamento dos ossos doados diminui a antigenicidade do enxerto, enquanto a irradiação diminui a chance de infecção e a desmineralização remove o conteúdo mineral, deixando somente o colágeno e morfógenos, aumentando o potencial osteoindutivo. As vantagens de alógenos sobre autógenos são a eliminação da necessidade de sítio doador durante cirurgia e a rápida disponibilidade. Entretanto, as desvantagens incluem rejeição, infecção e maiores períodos de reparo, o que tipicamente resulta em menos volume ósseo que o autógeno⁹⁰.

Os materiais aloplásticos são osteosubstitutos sintéticos facilmente disponíveis e que dispensam a necessidade de sítio doador do paciente. Idealmente, devem ser biocompatíveis com tecidos hospedeiros, não-antigênicos, não carcinogênicos e não-inflamatórios. Adicionalmente, eles devem ser suficientemente porosos e interconectivos para tecidos para permitir crescimento dentro e em volta do implante (osteocondução), capazes de estimular osteoindução, reabsorção e reposição por osso, radiopacos para permitirem boa visualização e distinção radiográfica, aptos a resistir à esterilização sem perder qualidades favoráveis, estáveis em várias temperaturas e sob umidade, baratos e facilmente obtidos. A maioria dos materiais aloplásticos são osteocondutores e as principais limitações são a reabsorção lenta e muitas vezes a cápsula de tecido conjuntivo que pode afetar estabilidade do enxerto⁶⁸. Materiais aloplásticos podem ainda apresentar várias desvantagens como rejeição, infecção, perda e toxicidade⁸⁷.

Os materiais xenógenos ou xenoenxertos podem conter colágeno ou hidroxiapatita, bem como a combinação de ambos^{97,123}. O colágeno é biodegradável e permite adesão, crescimento e diferenciação celular^{13,106}. A apatita natural é osteocondutora¹¹⁹ e tem se mostrado osteoindutora em alguns modelos *in vivo*^{47,126}. Vidal¹²¹ (1996) inicialmente testou o compósito natural formulado com 75% de hidroxiapatita e 25% de colágeno tipo I, de origem xenógena, observando no período de 57 dias em ratos na região suprapariosteal do crânio e em pequenos defeitos ósseos circulares em fêmur (diâmetro: 1-2mm), formação de osteóide e/ou osso imaturo circular aos grânulos de hidroxiapatita. Em design funcional^{18,116}, Silva et al.¹¹¹ (2009) comprovaram que o mesmo material preenchendo defeito ósseo crítico em crânio de ratos isoladamente mostrou-se biocompatível, osteocondutor e parcialmente biodegradável⁶ no período de 3 meses.

Os xenoenxertos bovinos devem receber um tratamento especial para evitar o risco de contágio da encefalopatia espongiforme conhecida como “*mal da vaca louca*” por meio dos príons, a hidroxiapatita é submetida a altas temperaturas (>1100° C por 3 horas). Além disto, o colágeno é extraído de gado rastreado, proveniente de área geográfica sem relatos de ocorrência de encefalopatias espongiformes e os tecidos utilizados (tendões e ossos) também são de baixo risco⁹².

Segundo Nefussi et al.⁸⁵ (1997), modelos *in vitro* de osteogênese permitem estudo da cinética da diferenciação osteoblástica. Muitos sistemas, incluindo células de calvária, células de endósteo e células medulares estromais mostram formação de nódulos ósseos *in vitro*. De acordo com a cinética celular baseada em autoradiografia e estudos microcinematográficos, quatro sucessivas etapas morfológicas de formação do nódulo ósseo podem ser distinguíveis: (a) proliferação celular com formação de camadas multicelulares; (b) mudanças fenotípicas na superfície celular com diferenciação celular; (c)

atividade celular com formação e maturação de matriz e processos de inclusão celular; (d) mineralização de matriz óssea medular com formação de superfície óssea ativa e osteócitos maduros. Em estudos *in vitro* utilizando células periosteais e endosteais de calvária de ratos (pré osteoblastos), observou-se a expressão das proteínas não-colagênicas Osteocalcina e Sialoproteína óssea (BSP) na fase de diferenciação osteoblástica, enquanto Osteonectina parece estar associada à fase de formação de matriz; a BSP associa-se exclusivamente a cristais nodulares e a Osteocalcina e a Osteonectina foram encontradas tanto em osteóide quanto na matriz mineralizada.

O uso do PRP isolado não leva ao sucesso no reparo de defeitos críticos mas sua potencialização com o cálcio mostrou um melhor desempenho⁸³.

Particularmente, várias pesquisas têm investigado o potencial de células derivadas de perióstio na diferenciação em células osteogênicas, representando uma interessante fonte alternativa à medula óssea nos últimos 10 anos^{19,48,82,127}.

Em relação ao potencial osteogênico, células derivadas de perióstio têm taxa de proliferação maior que células estromais medulares, refletindo este menor tempo de cultura celular em menor custo e risco de contaminação, apesar destas células apresentarem menos marcadores osteogênicos (como fosfatase alcalina e nódulos de mineralização) do que as células de medula óssea^{2,56}. Mesmo podendo encontrar células osteocompetentes na medula óssea, sua proporção é extremamente baixa (0,001-0,01%)⁹¹ e diminui com o passar do tempo¹².

Recentemente, células-tronco têm despertado grande atenção por conta de seu potencial uso em aplicações de engenharia tecidual. Um material ideal para enxertia óssea do ponto de vista biológico e biomecânico é aquele que consegue ser completamente reposto por novo osso formado pelo hospedeiro¹⁷.

Além da medula óssea²⁹, existem outras fontes teciduais para obtenção de células-tronco com o potencial

mesenquimal de se diferenciar em outras células, como: osso trabecular^{11,22,31}, tecido adiposo¹²², tecido muscular¹²⁵, polpa de dentes decíduos⁸⁴ e permanentes⁶⁹, papila dental⁵³, sinóvia¹²⁵, sangue periférico⁴³, derme⁷², placenta⁴², sangue^{14,23,101} ou parede^{66,98} de cordão umbilical e o periósteo^{10,35,52,58,89,107,112,115,119,123,128}.

Células-tronco mesenquimais adultas foram isoladas por Friedenstein, Petrakova⁴¹ (1966) e subsequentemente por outros investigadores, adotando a *nomina* de células plástico-aderentes ou unidades formadoras de colônia fibroblastóide (*colony-forming unit fibroblasts* ou *CFU-F*) para defini-las. Segundo Bari et al.¹⁰ (2006), periósteo é um tecido intermediário localizado entre osso e tecidos moles, contendo múltiplos tipos celulares (células de camada cambial, camada fibrosa, vasos sanguíneos e pericitos) que poderiam funcionar potencialmente como células progenitoras. Em trabalho avaliando potencial de crescimento e fenótipo de células periosteais adultos humanos, verificou depósitos crescentes de cálcio em cultura, atividade de fosfatase alcalina e presença de nódulos de mineralização, confirmando é possível, a partir de uma pequena biópsia de periósteo, ter uma boa fonte e de fácil acesso de células-tronco mesenquimais. Confirmando sua importância, Eyre-Brook³⁶ (1984) mostra que periósteo provê suprimento sanguíneo ao osso cortical e células osteoprogenitoras, importantes para regeneração óssea.

Em um trabalho utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea de camundongos transgênicos ColCAT3.6, carregadas por meio de esponja gelatinosa, Krebsbach et al.⁶⁸ (1998), comprovou ser possível fechar defeitos cranianos em camundongos imunocomprometidos em 2 semanas pós-transplante com terapia celular. O novo osso formado foi determinado como sendo de origem do doador pela imunoreatividade a alfa1 procolágeno cloramfenicol acetiltransferase que foi expresso exclusivamente pelas células

doadoras, sem haver a adição de fatores de crescimento ou morfogenéticos.

O trabalho de Redlich et al.⁹⁵ (1999) discute que células bem diferenciadas são difíceis de expandir em cultura e que muitas vezes perdem o potencial para diferenciação. Em contraste, células-tronco mesenquimais proliferam facilmente, mas direcionar estas células para a diferenciação osteogênica é ainda o maior desafio. Estes autores conseguiram isolar células de perióstio de tíbia de coelhos, carregá-las em carreador de ácido polilático glicólico e gel de fibrina, e os resultados mostraram que células de perióstio foram isoladas e expandidas in vitro com sucesso sem perda da expressão de marcadores osteogênicos. Eles conseguiram promover in vivo o reparo parcial em defeito crítico de calvária observado por análise histopatológica, com intensa formação de osso não calcificado nas margens ósseas e regiões centrais do defeito em 4 semanas, havendo fechamento do defeito em 65%, bem superior aos grupos de enxerto sem células (31%) e controle (22%). Sangue de cordão umbilical, de maneira similar à medula óssea, tem demonstrado conter células mesenquimais ou células progenitoras, que são linhagens primitivas que puderam diferenciar em pelo menos três tipos celulares: osso, cartilagem e gordura, sob condições apropriadas de cultura²³.

A pluralidade de sítios doadores de células-tronco mesenquimais ou osteoprogenitoras também se estende às diferentes espécies animais, já tendo sido isoladas CTMA em: homem (66%), rato (12%), coelho (8%), camundongo, cão (4% cada), cabra (3%), cavalo (2%), porco, ovelha e macaco (1% cada)¹¹¹.

Estudos in vivo, utilizando diferentes animais experimentais (camundongos, ratos, coelhos, cabras, cães e primatas) mostraram qualitativamente uma boa biocompatibilidade tecidual e quantitativamente uma osteogênese aumentada no sítio de implantação, com efeito direto em defeitos ósseos críticos induzidos ou mesmo ectopicamente. A enxertia de CTMA em tecido

subcutâneo demonstrou processo de mineralização dentro de pouco tempo (em média, 4 semanas), sendo consideradas um material bioativo e concomitantemente inerte (ausência de resposta inflamatória intensa, reação de corpo estranho exacerbada e/ou focos de necrose). Defeitos ósseos críticos, ou seja, que não reparam espontaneamente, induzidos em diferentes sítios anômicos servem como bom modelo para estudar a possibilidade de osteogênese em leitos receptores desfavoráveis ou muito extensos^{21,27}.

A terapia celular pré-clínica mostra-se então favorável para oferecer melhor grau de osteogênese de 4 a 12 semanas pós- enxerto, refletindo o resultado positivo de defeitos cranianos e mandibulares em interesse às cirurgias craniofaciais para seres humanos, enquanto resultados promissores em defeitos femorais, radiais e ulnares abrem possibilidade de aplicabilidade clínica em cirurgia ortopédica¹¹¹.

Muitos sistemas de culturas de células ósseas apresentam limitações, pois contam com uma inerente instabilidade e possibilidade de comportamentos aberrantes associados às diversas linhagens celulares. No caso das culturas primárias de osteoblastos, os sistemas apresentam uma mistura de células osteoblásticas em diferentes estágios de diferenciação além de possivelmente células de outras linhagens. Embora as culturas tenham limitações, quando plaqueadas apropriadamente desenvolvem-se culminando na formação de nódulos de mineralização⁶¹.

Em ensaios para mineralização *in vitro*, a suplementação das culturas celulares com ácido ascórbico e um fosfato (β -glicerofosfato) é necessária. O ácido ascórbico é necessário como co-fator nas reações de *cross-link* do colágeno, promovendo a formação de matriz orgânica estável. Em estudos onde diversas concentrações de ácido ascórbico foram utilizadas mostrou-se que a síntese de colágeno foi dose-dependente, e também o aumento da atividade da fosfatase alcalina. Já o β -

glicerofosfato é adicionado às culturas de células ósseas com intuito de induzir à osteogênese e promover depósitos de fosfato de cálcio. O mecanismo pelo qual o β -glicerofosfato induz a mineralização está intimamente relacionado à alta atividade da fosfatase alcalina nas células osteoblásticas. O β -glicerofosfato é rapidamente hidrolisado pela fosfatase alcalina produzindo altos níveis locais de íons fosfato criando as condições químicas para a deposição mineral^{26,77}.

Um conhecido indutor de diferenciação e de crescimento celular em células derivadas do estroma medular é a dexametazona (DEX). Este glicocorticóide tem mostrado eficiência na indução da atividade da fosfatase alcalina, na potencialização da produção de AMPc em resposta ao paratormônio. Quando associado ao β -glicerofosfato e ácido ascórbico, a DEX estimula o processo de mineralização *in vitro*⁵⁷. Entretanto, DEX não é estimuladora de todos os genes considerados parte do programa de diferenciação de osteoblastos. Em outros modelos de diferenciação de células, a DEX aumenta consideravelmente a atividade de fosfatase alcalina e potencializa a produção de AMPc, mas não estimula a produção de colágeno em células humanas e de roedores¹⁰⁵. Nas culturas derivadas de estroma medular a dexametazona é necessária para a formação dos nódulos de mineralização³².

Em células da medula Kanou et al.⁶⁰ (2005) mostraram que há maior potencial osteogênico em periósteo previamente estimulado ao reparo. Em trabalho utilizando ratos, o grupo experimental onde houve liberação cirúrgica de periósteo de tíbia e imediato reposicionamento, para utilização posterior em 7 dias como enxerto livre autógeno em área de defeito crítico de calvária, obteve maior formação de osso, comprovada através de análise tomográfica microcomputadorizada, histológica e imunohistoquímica. Por reconstrução tridimensional, em acompanhamento nos dias 7, 14 e 21 dias pós enxerto, houve no último estágio deste grupo experimental maior formação óssea

periférica e central, culminando em fechamento quase total do defeito, o que não ocorreu aos demais grupos testados (enxerto imediato de perióstio de tibia, enxerto de perióstio intacto com incisão subcutânea prévia de 7 dias porém sem realização de retalho, para excluir efeito inflamatório sobre formação óssea, e controle/sem enxerto). Em 14 dias, houve ativa formação óssea mostrando estruturas medulares no defeito, e em 21 dias, preenchimento total do mesmo por osso neo formado, fundindo-se com osso residual, fusão esta que não aconteceu nos demais grupos testados. Houve intensa marcação positiva para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteína óssea morfogenética (BMP) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no grupo experimental com liberação de perióstio em 0 dias (254 ± 16.5 , 274 ± 20.6 , 149 ± 8.03 , respectivamente) se comparada às médias em 7 dias dos grupos com enxerto de perióstio sem retalho total prévio (89.4 ± 5.35 e 72.8 ± 11.5 ; 121 ± 5.6 e 106 ± 5.71 ; e 49.0 ± 6.39 e 36 ± 5.4 , respectivamente). Esses dados confirmam que a estimulação cirúrgica potencializa em muito a capacidade osteogênica de células de perióstio enxertadas em defeito craniano in vivo.

Segundo Seebach et al.¹⁰⁹ (2007), a severidade de um trauma ósseo e o gênero podem afetar a capacidade proliferativa (ou densidade celular) e de reserva de células-tronco mesenquimais de medula óssea. Numa comparação entre indivíduos saudáveis, com desuniões atróficas, monofraturas e múltiplos traumas, de ambos os sexos, foi observado in vitro que significantes diferenças foram encontradas entre pacientes do sexo feminino, com mais unidades formadoras de colônia fibroblastóide (CFU-F) em pacientes com múltiplos traumas (48 ± 21), seguidos por voluntários saudáveis ($18,7 \pm 3,3$), pacientes com monotrauma (15 ± 10) e desuniões atróficas ($6,3 \pm 4,1$). Já no sexo masculino, significantes diferenças também foram encontradas, com mais CFU-F entre pacientes com múltiplos traumas (59 ± 25) do que indivíduos saudáveis (54 ± 17), pacientes com desuniões atróficas

(14 ± 14) e monofraturados (14 ± 11). Em termos de densidade celular, o sexo masculino teve maior representatividade nas médias dos indivíduos saudáveis, desuniões atróficas enquanto as mulheres obtiveram melhor quantificação em monofraturas e múltiplos traumas. Isso sugere que o trauma estimula a mobilização, replicação e diferenciação dessas células, sendo sua frequência média aumentada em pacientes com múltiplas injúrias (sexo feminino) e diminuída em casos de desunção atrófica (mulheres/homens) e monofraturas (homens).

A diferenciação osteogênica pode ser detectada a partir do aumento da expressão gênica de certos marcadores mais comumente utilizados. Fosfatase alcalina é considerada um marcador inicial da osteogênese *in vitro*, pois durante a diferenciação osteogênica, os osteoblastos exibem forte atividade do marcador²³, detectável por imunomarcacão³, reacão em cadeia da polimerase (PCR)¹¹⁸ ou atividade enzimática via espectrofotometria (pico de expressão em 10-14 dias pós-osteoiduão em cultura celular)^{67,125}. Nódulos de mineralização são normalmente evidenciados pela técnica de Von Kossa, método qualitativo baseado na substituição de íons Ca^{2+} da matriz calcificada por átomos de prata, revelando os minerais de cálcio como pontos negros¹²⁷. A técnica de Von Kossa isoladamente não é um fator de confirmação ossificação¹⁶. Dentre as proteínas e genes que podem ser utilizados para a detecção da osteogênese, pode-se citar o colágeno I, que é a proteína mais abundante no osso conhecida por exercer um importante papel na produção de matriz e que pode ser detectado por dosagem⁹, imunomarcacão^{74,78} ou PCR¹¹⁹. A osteocalcina é um importante marcador para diferenciação terminal do osteoblasto, podendo ser detectada por imunomarcacão⁵³ ou PCR²⁵.

A osteopontina é um marcador ósseo não específico que é expresso bimodalmente, presente tanto no início (fase proliferativa) quanto no fim (após começo da mineralização) da osteogênese⁶⁵, podendo ser detectada por imunomarcacão⁵⁵ ou

PCR¹². A osteonectina é considerada um potencial regulador da mineralização em tecidos calcificados, devido a sua afinidade a ácido hialurônico¹²⁷, hidroxiapatita e colágeno I, detectável através de imunomarcação⁵⁴ ou PCR^{25,119}. Cbfa 1 (ou Runx2) é reportado como gene-mestre da diferenciação osteoblástica, sendo seus transcritos detectados por PCR^{66,119}. A sialoproteína óssea (BSP) é um marcador ósseo tardio, produzido por osteoblastos diferenciados formando osso, podendo se ligar a colágeno, hidroxiapatita em formação e tem sido isolado em células ativamente mineralizando uma matriz de colágeno I¹¹⁸. O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é um potente fator de crescimento osteogênico que estimula a síntese de proteínas da matriz e tem grande efeito sobre as células responsáveis pela regeneração óssea, atuando na quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos, aumentando e acelerando a regeneração óssea, detectado por PCR. Osterix é um fator de transcrição essencial que regula a diferenciação e formação óssea detectável por PCR⁵⁸, camundongos deficientes geneticamente apresentam bloqueio da maturação de osteoblastos, perdendo a capacidade de formar osso. BMP2, em altas concentrações, funciona como uma proteína osteoindutiva conhecida por estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais durante a linhagem osteogênica⁵⁷. A radiografia convencional⁹⁴ e a radiografia computadorizada¹⁰² são também recursos utilizados na avaliação do reparo ósseo¹¹¹.

USO DE BIOMATERIAIS NA TERAPIA DE PERDAS ÓSSEAS

Embora haja grande progresso no desenvolvimento de substitutos ósseos, ainda não existe o biomaterial ideal que mimetize as propriedades e características de células viáveis

especializadas em produzir este tecido. Dessa forma, a bioengenharia tecidual surge como uma ferramenta capaz de utilizar células isoladas, fatores de crescimento que induzem proliferação celular (como proteínas ósseas morfogenéticas) e substratos adequados que agem como carreadores de células ou proteínas, objetivando criar tecidos autógenos em laboratório e possibilitar sua aplicação como agentes terapêuticos^{24,45,71,86,117}.

A formação óssea in vivo é resultante de um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores incluindo o biomaterial carreador, os parâmetros dependentes do hospedeiro e o comportamento das células doadoras em relação ao seu potencial osteogênico^{49,62}.

Segundo estudo de Dahlin et al.²⁸ (1991), ratos Sprague-Dawley que sofreram uma trefinação de 8 mm em calvária e tiveram defeito coberto por membrana no ecto e endocrânio mais osso particulado exibiram rápida e substancial regeneração de osso se comparadas ao grupo controle (menor osteogênese reparativa), indicando que o uso de membrana de barreira impede a rápida migração de células de tecido conjuntivo o que pode prevenir a produção de osso.

Dupoirieux et al.³⁴ (2001), observaram que membranas não absorvíveis tiveram melhor resultado na reparação de defeitos ósseos em ratos e concluíram que a composição da membrana é fundamental para o reparo.

Gosain et al.⁴⁴ (2003) desenvolveram um estudo que avaliou a regeneração óssea em coelhos brancos da Nova Zelândia, usando calvariectomias experimentais para investigar a influência da exclusão diferencial da dura-máter e pericrânio em defeitos ósseos de 100mm² (10x10mm) de animais maduros e imaturos usando membranas de PTFE. Considerando que a reossificação dentro de defeitos de calvária representa uma combinação de novo osso central e periférico, em análise histopatológica após 12 semanas, foi observado que a densidade de novo osso periférico era significativamente maior que a

densidade de novo osso central em todos os grupos (infantes e adultos) exceto os controles. A dura foi considerada a maior fonte de osso central, já que os grupos de bloqueio da dura que utilizaram PTFE duplo ou apenas dural resultaram em grande decréscimo na densidade óssea central em animais maduros e imaturos, sendo comparativamente mais osteogênica do que o pericrânio. Paradoxalmente, isolamento do pericrânio em animais maduros resultou em significativa redução na área total de novo osso, enquanto o contato pericranial pareceu aumentar a formação de novo osso periférico, com o grupo controle (sem bloqueio dural ou pericranial) tendo a melhor área total de novo osso.

Taga¹¹³ (2004) realizou estudo para avaliar histológica e morfometricamente o reparo de defeitos de tamanho crítico promovido pela dupla membrana de osso cortical bovino (Gendern, 250-300 m de espessura). Um defeito de 10 mm de diâmetro foi produzido na calvária de 40 cobaias obtidos, neste estudo, indicaram que o uso da dupla membrana de cortical óssea bovina desmineralizada e o mantenedor de espaço promoveram um ótimo reparo do defeito de tamanho crítico em calvária de cobaias levando à remoção de ambas as corticais. Em 20 animais, o lado epidural do defeito foi protegido com uma membrana sobre a duramáter e depois preenchido com coágulo sangüíneo, o lado ectodural foi recoberto com uma segunda membrana. Um suporte de osso alogênico desmineralizado inativado (3 mm de diâmetro) foi usado como mantenedor de espaço. O defeito, no grupo controle, foi preenchido com coágulo sangüíneo e o mantenedor de espaço na região central. Após os períodos de 1, 3, 6 e 9 meses pós-cirurgia, as calotas foram coletadas, fixadas, radiografadas, processadas para análise histológica. Os resultados obtidos, neste estudo, indicaram que o uso da dupla membrana de cortical óssea bovina desmineralizada e o mantenedor de espaço promoveram um ótimo reparo do defeito de tamanho crítico em calvária de cobaias.

Para promover uma adesão celular local, crescimento e proliferação in vivo, há necessidade de biomateriais

no campo de transplante celular. Jäger et al.⁵⁵ (2005), comparando a eficácia de 3 polímeros na proliferação e diferenciação osteogênica de células mesenquimais (ácido polilático, poligalactina 910/polidioxanone e colágeno I/III), observou in vitro que todos os grupos apresentaram aumento no acúmulo local de íons cálcio sob estimulação osteogênica por 28 dias, tendo os carreadores colágeno I/III e ácido polilático propriedades osteoindutivas sem estimulação osteogênica. Colágeno I/III teve no início do experimento maior potencial de adesão celular, enquanto ácido polilático mostrou o maior número de células presentes ao fim do experimento, ao contrário de poligalactina 910/polidioxanone, com significativo efeito citotóxico, porém interessantemente possuindo maior conteúdo de cálcio.

Estudo realizado com preenchimento de defeitos críticos (8 mm) em ratos Wistar usando matriz orgânica óssea bovina (Genox®, Baumer) demonstrou grande diminuição do defeito ósseo com o material, em análises radiográfica (diminuição de 60% da área média do defeito pós 3 meses x grupo controle sem enxerto e 39% da área média pós 6 meses x grupo controle) e histológica (redução de osso devido a neo formação óssea seguindo as bordas do defeito ósseo). A maioria dos animais apresentou excelente resposta à implantação do enxerto, com ausência de inflamação e significativa formação óssea comparada ao grupo controle. Contudo, presença de foco de reação granulomatosa do tipo corpo estranho próxima ao enxerto observada em poucos casos. A presença de células gigantes multinucleadas e reação inflamatória do tipo corpo estranho são conhecidos marcadamente por inibir nova formação óssea⁸⁰.

Schantz et al.¹⁰⁴ (2003), combinando matrizes mistas (scaffolds) tridimensionais e BMP derivadas de medula óssea obtiveram resultados positivos na terapia de defeitos críticos em calvária de coelhos Nova Zelândia.

Em 1996, Ripamonti⁹⁶ observou que a hidróxiapatita com porosidades apresenta um melhor potencial osteoindutor.

Habibovic et al.⁴⁷ (2006) observou que matrizes tridimensionais que possuíam em sua estrutura microporos dentro de macroporos resultava em uma melhor adesão de células osteoprogenitoras e conseqüente melhora do reparo.

Quanto à forma de distribuição, células-tronco mesenquimais ou osteoprogenitoras podem ser aplicadas via sistêmica ou tópica. A forma sistêmica não requer a presença de materiais carreadores, pois se baseia na infusão sanguínea^{20,51} ou percutânea¹¹⁵.

Alguns materiais de enxertia híbridos tridimensionais ao serem utilizados no reparo de perdas ósseas associados a culturas de células osteoprogenitoras não tiveram um resultado positivo por falta de uma melhor adesão dos osteoblastos ao biomaterial^{7,100}.

Colágeno é um biomaterial que apresenta boas propriedades de degradação e de viabilidade celular (adesão, crescimento e diferenciação), em análise topográfica e química¹³.

A hidroxiapatita, que pode ser natural ou sintética, já está sendo considerada um controle positivo para formação óssea ectópica via osteocondução in vivo por alguns autores^{62,119}, a sua associação com TCP mostra indução de CTMA e conseqüente formação óssea, distribuída através de sua estrutura porosa, numa sugerida proporção ótima de 20:80⁸. A associação da hidroxiapatita com zinco melhora seu potencial osteoindutor³⁷ e seu potencial bioabsorvível facilita sua substituição por tecido ósseo melhorando o reparo³⁸.

Schmitz, Hollinger¹⁰⁸ (1986) sugerem um protocolo in vivo para avaliação de novos materiais de reparo ósseo maxilofaciais, seguindo uma hierarquia de modelos animais antes de testes de fase I em humanos serem realizados.

Mah et al.⁷⁶ (2004) mostrou em defeitos cranianos de 4mm de diâmetro em ratos machos adultos Sprague-Dawley que BioOss® (osso bovino desmineralizado) propiciou maior crescimento ósseo em 4 meses, dirigido ao redor do implante e

centro do defeito, seguido de Bioplant® HTR (polímero compósito, resultante da combinação de polimetilmetacrilato, polihidroxiletilmetacrilato e carbonato de hidróxido de cálcio), Orthomatrix® HA (cerâmica de hidroxiapatita sintética) e Interpore® 200 (cerâmica de hidroxiapatita derivada de coral poroso). Biogran® (biovidro a base de fosfato de cálcio) e Pro-Osteon® 500R (carbonato de cálcio reabsorvível) não mostraram incorporação do implante ao osso. Atividade de fosfatase alcalina medida no mês 2 confirma os achados histopatológicos dos materiais testados.

Os osteoblastos criam um micro-ambiente suficiente para preservar a competência osteogênica, atingindo a completa maturação com depósito de matriz extracelular, mantendo interações recíprocas e adaptativas célula-célula e célula-matriz extracelular³⁹. O estudo pioneiro de Sakata et al.¹⁰³ (2006), enxertando células de periósteo mandibular humano carregadas por uma esponja colágena tridimensional em defeito ósseo de tamanho crítico em calvária de rato imunossuprimido, demonstrou em 5 semanas significativo crescimento ósseo central ($59,9 \pm 10,5\%$) se comparado ao controle ($0,5 \pm 5,02$). Hayashi et al.⁴⁸ (2008) mostraram que a associação de células derivadas de periósteo alógeno (de diáfises de fêmur e tíbia) e hidroxiapatita implantada no tecido subcutâneo de ratos gera osso ectópico no período de 6 semanas. Rodrigues et al.⁹⁷ (2003) acrescentaram um dado favorável no campo da bioengenharia tecidual: compósito de hidroxiapatita e colágeno I testado apresenta adesão e espraio de osteoblastos humanos dentro de 11 dias em cultura celular.

O fosfato octacálcio sintético (OCP) aumenta a formação óssea subperiosteal, quando implantado pode ser reabsorvido e substituído por osso com o tempo, mostrando que este material possui potencial e poderá ser utilizado como um eficaz substituto ósseo⁵⁹.

Outros materiais tem mostrado um bom potencial no tratamento de perdas ósseas como o estireno de vinil⁸¹ e o fosfato de cálcio⁷³.



Proposição

PROPOSIÇÃO

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial terapêutico da associação de xenoenxerto bovino com células derivadas de perióstio autógeno de ratos para tratamento de defeito crítico no crânio de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e cultivar células derivadas de perióstio autógeno (CDPA) de ratos.
- Demonstrar a propriedade de osteodiferenciação das CDPA in vitro.
- Analisar o comportamento biológico e potencial osteogênico da associação de CDPA + biomaterial enxertada em defeitos críticos em crânio de ratos.



Material e método

MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada segundo as normas recomendadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal Fluminense (Registro 04/08) para o estudo in vivo (Anexo 1).

ESTUDO IN VITRO

- **Coleta de amostras e proliferação celular**

Dez espécimes de *Rattus norvegicus albinus*, machos adultos com 2 meses de idade e 300 g, foram pré-anestesiados durante 1 minuto por inalação de éter etílico a 97% (VETEC, RJ) para facilitar seu manejo (Figura 1A). A seguir foi feita anestesia geral por aplicação intramuscular de 60 mg/kg de ketamina (Francotar, Virbac, Brasil) e 12 mg/kg de xilazina (Rompum, Bayer, Brasil) próxima do músculo reto femoral da pata (Figura 1B), mostrando duração de efeito de 40 minutos⁵.



FIGURA 1 - PRÉ-ANESTESIA DO ANIMAL COM ÉTER (A), APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE 60 MG/KG DE KETAMINA E 12 MG/KG DE XILAZINA(B).

Quando os animais ficaram completamente imóveis, foram colocados sobre um campo operatório esterilizado, tiveram a região fronto-parietal tricotomizada e degermada com clorexidina alcoólica 0,5% (Rioquímica, Brasil). O acesso ao periósteo foi realizado por meio de uma incisão semilunar na derme da calvária e do rebatimento de um retalho dividido, preservando o periósteo aderido ao osso. Quatro incisões delimitaram a área de 1 cm² do tecido coletado, cuidadosamente liberado por meio de cinzel da margem para o centro e sendo em seguida removido com uma lamina nova de bisturi. O animal foi suturado (Figura 2).



FIGURA 2 - TRICOTOMIA, INCISÃO, DEMARCAÇÃO DO TECIDO COLETADO, REMOÇÃO DO PERIÓSTEO E SUTURA NOS *RATTUS NORVÉGICUS ALBINUS*.

Enquanto sua biópsia foi transportada para o laboratório de Biomateriais, em tubo de centrífuga contendo DMEM:HAM F12 (Cultilab, Brasil) gelado e em soro fetal bovino (Figura 3).



FIGURA 3 - TRANSPORTE DA BIÓPSIA EM TUBOS DE CENTRÍFUGA CONTENDO DMEM:HAM F12.

Em período inferior a 1 hora, e processada em ambiente estéril de fluxo laminar (Biozard Classe II 36208, Labconco, Estados Unidos). Em uma placa de 24 poços, o perióstio foi lavado 3 vezes com tampão fosfato em solução salina estéril (PBS) e incubado num poço com 1 mL de colagenase 0,25% durante 2 horas, realizando-se fragmentação auxiliar da peça com lâmina de bisturi e/ou tesoura (Figura 4). Após digestão enzimática, as células foram centrifugadas (Centrifuge 5702R, Eppendorf, Estados Unidos) a 163 g por 5 minutos em 2000 rpm, ressuspensas em DMEM:HAMF12 com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e mantidas em container plástico de 25 cm² (TPP, Estados Unidos) (Figura 5), acondicionadas em incubadora (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de atmosfera úmida.



FIGURA 4 - A BIOPSIA SENDO TRABALHADA EM FLUXO LAMINAR NO QUAL FOI LAVADA EM PBS, SOFREU DIGESTÃO ENZIMÁTICA E CLIVAGEM.

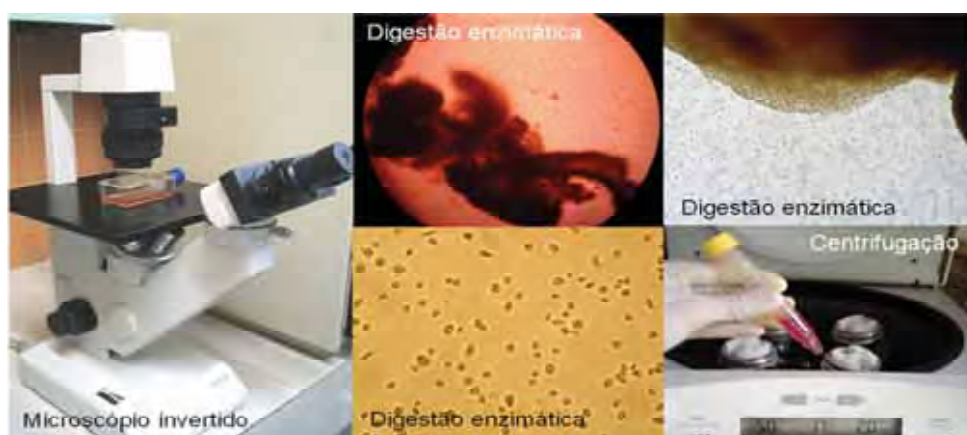


FIGURA 5 - APÓS A DIGESTÃO ENZIMÁTICA E CLIVAGEM O MATERIAL FOI CENTRIFUGADO E OBSERVADO AO MICROSCÓPIO INVERTIDO

Trocas de meio foram realizadas a cada 2 dias. Para a quantificação celular foi utilizada a câmara de Neubauer como preconizado por Freshney⁴⁰ (2000), fazendo-se a exclusão de células mortas ou não viáveis coradas com azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, Brasil). Uma alíquota de 20µL da suspensão celular em 1mL foi misturada em igual volume ao azul de trypan, homogeneizada e transferida para a câmara. Utilizando a equação: $NC \times D \times 10^4 / Q$, onde NC= número de células viáveis contadas, D= diluição da amostra, Q= quadrantes da Câmara de Neubauer utilizados na contagem (Figura 6).

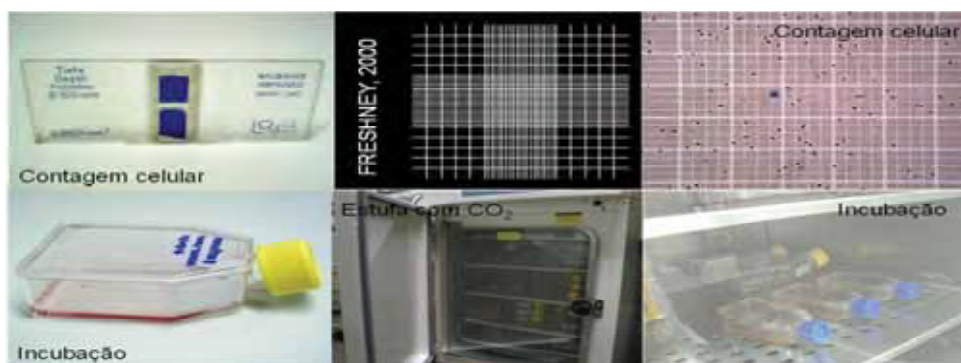


FIGURA 6 - A CONTAGEM CELULAR NA CÂMARA DE NEUBAUER, A INCUBAÇÃO EM CONTAINERS PLÁSTICOS NA ESTUFA.

▪ **Osteodiferenciação**

Células derivadas de perióstio de ratos (passagem 2) foram semeadas em placa de 24 poços e na densidade de $3,0 \times 10^4$ células por mL em DMEM:HAM F12 com 20% soro fetal bovino. Após 24 horas iniciais para adesão celular, foi realizada osteoindução através de suplementação com 20nM de dexametazona (Sigma-Aldrich, Brasil), 50µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Brasil) e 10mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, Brasil), com troca diária. O experimento foi realizado em quadruplicata, nos tempos experimentais: 7, 14, 21 e 28 dias. Foram utilizados como marcadores de osteogênese in vitro:

fosfatase alcalina, dosagem de cálcio (análises bioquímicas quantitativas de produção de tecido ósseo) e coloração de Von Kossa (análise citoquímica qualitativa de mineralização) (Figura 7B). Para avaliação da atividade enzimática da fosfatase alcalina, o meio de cultura foi coletado (1 mL), transferido para um microtubo (Eppendorf, Estados Unidos) e congelado a -20°C ; posteriormente, alíquotas de $100\mu\text{L}$ foram adicionadas ao meio de reação utilizando o Kit Labtest para Fosfatase Alcalina (Enzipharma, Brasil), deixando incubar por 10 minutos a 37°C , adicionado $100\mu\text{L}$ de NaOH 1,0 M e paralisada a reação. A densidade óptica foi medida em espectrofotômetro DU 800[®] (Beckman Coulter, Estados Unidos) (Figura 7A), no comprimento de onda de 405 nm. Para quantificar presença de cálcio no sobrenadante (ou cálcio livre) e no precipitado (ou cálcio aprisionado) da cultura celular, foi utilizado o Kit Labtest para Cálcio (Enzipharma, Brasil); o meio de cultura foi coletado e congelado a -20°C em microtubos (Eppendorf, Estados Unidos) até o momento da dosagem, enquanto as células e a matriz extracelular aderidas (precipitado) foram digeridas em HCl 0,5 M durante 18 horas em geladeira, o conteúdo de cada poço foi coletado individualmente em microtubos e congelado até o momento da dosagem. A leitura das amostras foi realizada em 560 nm no espectrofotômetro DU 800[®] (Beckman Coulter, Estados Unidos), utilizando o cálcio padrão do kit como referência, como o branco para calibração do aparelho a água destilada (para o meio de cultura) e o HCl 0,5M (para o pellet). A concentração de cálcio também foi determinada no meio de cultura suplementado com meio osteogênico como referência. Todos os resultados tabelados da bioquímica foram expressos utilizando o processador de gráficos Prism 5.0 (GraphPad Software, Estados Unidos) usando teste *t* (não paramétrico). Para avaliação citoquímica foi realizado o método de Von Kossa, que permite identificar a matriz extracelular mineralizada sob a forma de nódulos de mineralização¹²⁷. Foi realizada a substituição do meio de cultura por formol 10% para fixação durante 10 minutos, a remoção do formol, a lavagem com

PBS por 10 minutos, o acréscimo de nitrato de prata a 5% com exposição à luz ultravioleta durante 60 minutos, 3 novas lavagens com PBS, a imersão em hipossulfito de sódio 5% por 3 minutos, a coloração com safranina 0,5%, a análise em microscópio invertido de contraste de fase Labomed TCM 400 (Feldmann Wild Leitz, Brasil) e documentação fotográfica com máquina Canon Powershot A310 3.2 MegaPixel (Canon, Brasil).

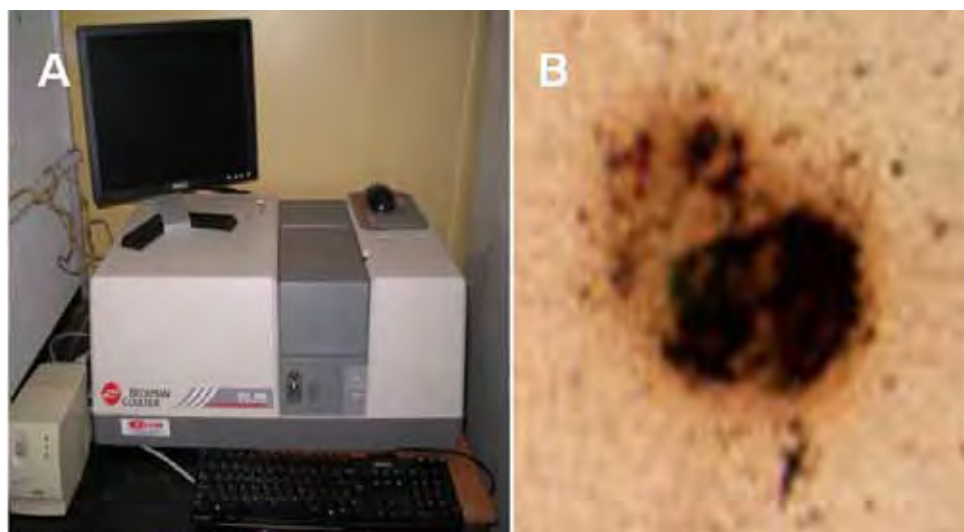


FIGURA 7 - O ESPECTROFOTÔMETRO(A) E UM NÓDULO DE MINERALIZAÇÃO PELA COLORAÇÃO DE VON KOSSA(B).

▪ **Bioengenharia tecidual**

Considerando a adsorção de proteínas como importante etapa envolvida na adesão de células osteogênicas a biomateriais⁷, o xenoenxerto bovino natural constituído de 75% de hidroxiapatita e 25% de colágeno I (HA/Col), na disposição de pastilha de 8 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura, foi previamente incubado em placa de 24 poços por 24 horas em estufa, com DMEM:HAM F12 com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, realizado plaqueamento de $1,0 \times 10^6$ células derivadas de periosteio autógeno (CDPA) (Figura 8A) na passagem 2 sobre o material e mantido o conjunto em cultura celular por 6 dias¹²⁷, até o momento do implante do conjunto CDPA+HA/Col (Figura 8B).

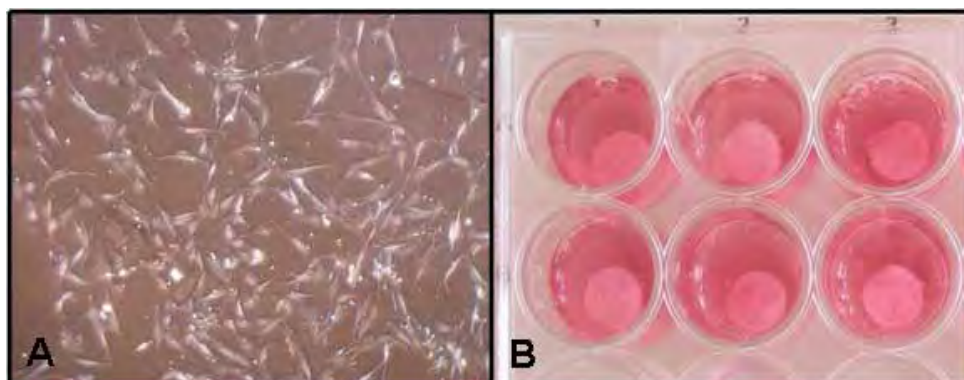


FIGURA 8 - CÉLULAS DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO (CDPA, 400X). INCUBAÇÃO DO CONJUNTO CDPA+HA/COL (B).

Amostras adicionais (n=3) foram processadas para avaliação morfológica ultra-estrutural da adesão células-biomaterial no tempo de incubação prévio à implantação, seguindo o protocolo: fixação em solução de Karnovsky em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 1 hora, lavagem com o tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 1 hora, imersão em soluções crescentes de etanol (1 banho de 30%, 50%, 70% e 90% e 3 banhos de 100%) por 10 minutos cada sempre em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), desidratação em aparelho de ponto crítico (CPD.030, Bal-tec, Alemanha), metalização em ouro e análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM 5800LV, Suécia).

ESTUDO IN VIVO

▪ *Ensaio funcional*

Defeito crítico em crânio de rato. 40 animais (incluindo os 10 dos quais previamente removeu-se as CDPA) foram anestesiados, submetidos à tricotomia e degermação conforme procedimento já descrito. Foi realizada uma incisão semilunar, seguida de retalho total com o auxílio de descolador do tipo Molt e cinzel de Ochsenbein nº 1, expondo a cortical óssea da

região interparietal. Com uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro (Sistema de Implantes Nacionais, Brasil) acoplada a um contra-ângulo redutor com rotação de 1:16 e irrigação externa (Anthogyr S/A, França) e micromotor cirúrgico (VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda., Brasil) com irrigação abundante e contínua a base de solução fisiológica, realizou-se uma craniotomia bicortical, expondo a dura-máter sem lesão da mesma ou do encéfalo³⁸ (Figura 9). O fragmento osteotomizado foi delicadamente retirado e efetuado preenchimento do defeito com uma das 4 modalidades terapêuticas: Grupo 1 (coágulo sanguíneo) (Figura 10A), Grupo 2 (osso autógeno, da própria calota retirada para confecção do defeito, particulado com macerador de osso) (Figura 10B), Grupo 3 (HA/Col) (Figura 10C), e Grupo 4 (HA/Col associado a CDPA previamente semeadas sobre o material) (Figura 10D).

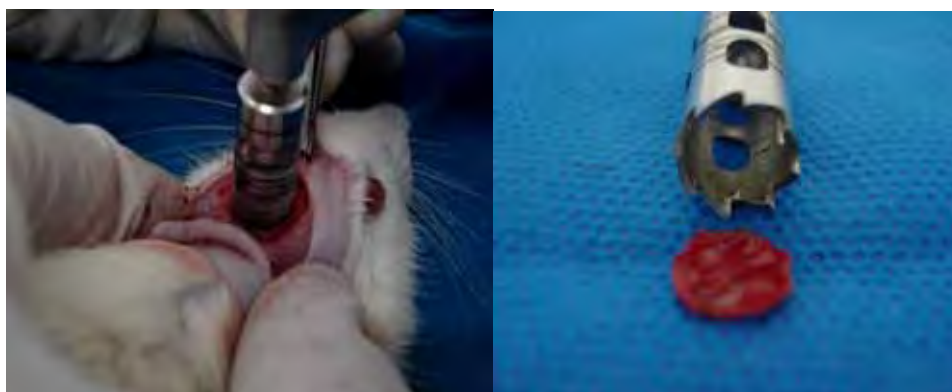


FIGURA 9 - CRANIOTOMIA REALIZADA COM A TREFINA DE 8 mm CONFECCIONANDO O DEFEITO CRÍTICO.

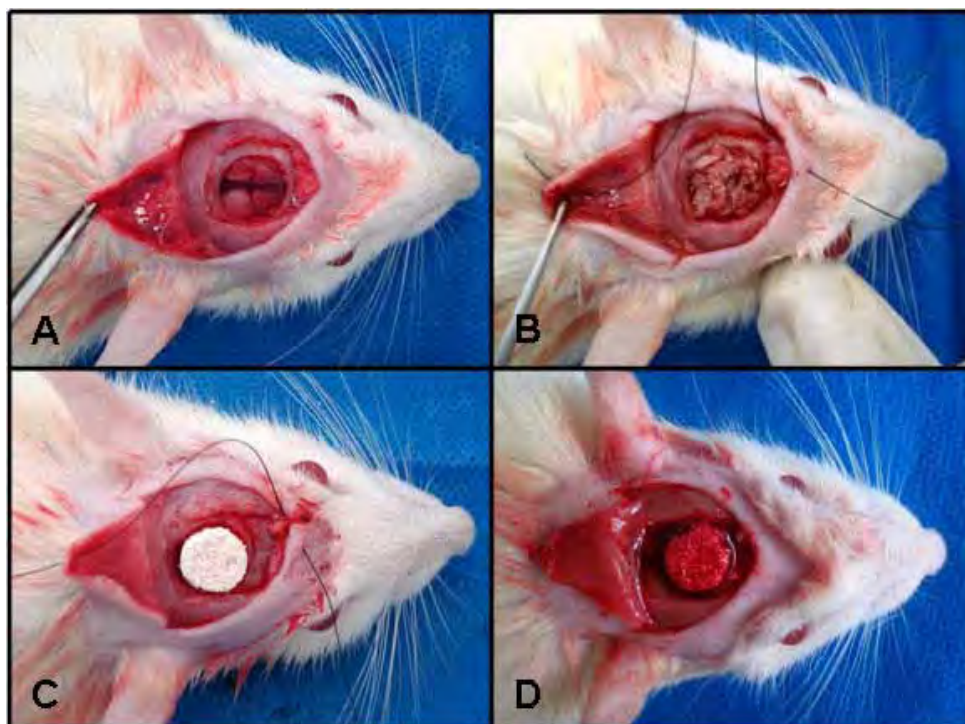


FIGURA 10 - DEFEITO ÓSSEO DE TAMANHO CRÍTICO (DIÂMETRO=8 mm), PREENCHIDO POR COÁGULO SANGUÍNEO (A), OSSO AUTÓGENO PARTICULADO (B), XENOENXERTO ACELULAR (C) OU XENOENXERTO ASSOCIADO A CÉLULAS DERIVADAS DE PERIÓSTEO AUTÓGENO (D).

Em seguida, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4.0 (Ethicon Inc, Estados Unidos)³⁸. Os ratos foram deixados em gaiolas individuais com ração peletada (Nuvilab CR1, Nuvital, Brasil) e água *ad libitum*, não havendo intercorrências pós-operatórias significantes durante o experimento. Os sacrifícios foram realizados nos tempos experimentais de 1 mês (n=20) e 3 meses (n=20) pós cirurgia, com 5 animais por terapia (n=4), totalizando 40 amostras. Os animais foram mortos com sobredose de solução anestésica, o que causou a morte sem dor ou sofrimento. Constatada a morte do animal, foi realizada necrópsia contendo a área do defeito e sua periferia utilizando micromotor odontológico e disco de Carborundum (Figura 11), sendo o material fixado por 48 horas em formol 4% tamponado com pH 7,2. O

encéfalo foi removido para melhorar a captação das imagens radiográficas, visto que não se tratava do alvo desta pesquisa.

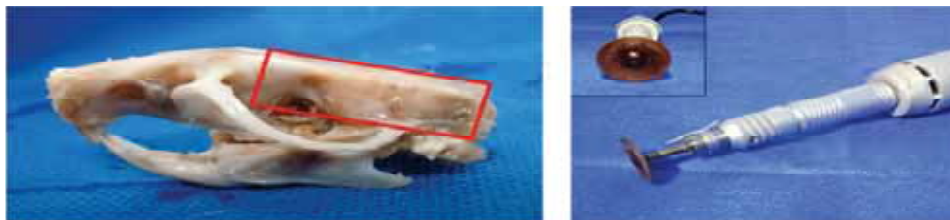


FIGURA 11 - ÁREA DA NECROPSIA DELIMITADA E MICROMOTOR COM DISCO DE CARBURUNDUM PARA O CORTE DA PEÇA.

▪ ***Processamento e análise radiográficos***

Para a realização de radiografias digitais, foram utilizados microfoco emissor de raio-X (FXS-100.10, Feinfocus, Estados Unidos) (Figura 12), placa de fósforo para detecção da imagem latente (Image Plate IPX, GE IT, Alemanha) e scanner de mesa (CR-50P, GE IT, Alemanha) (Figura 13), tendo como parâmetros: tensão de 40 kV, corrente de 125 μ A, tempo de exposição de 600 segundos, distância fonte-detector de 2 m, distância fonte-objeto de 40 cm, fator de magnificação de 5x, tamanho do pixel de 50 μ m e tamanho focal do raio-X de $\sim$ 10 μ m. Foi realizada análise descritiva, comparando o efeito do tempo e do tratamento das modalidades terapêuticas apresentadas.



FIGURA 12 - RADIOGRAFIA DIGITAL - IMAGE PLATE: IPX (GE IT) TUBO DE RAIOS X: FXS-100.10 (FEINFOCUS).

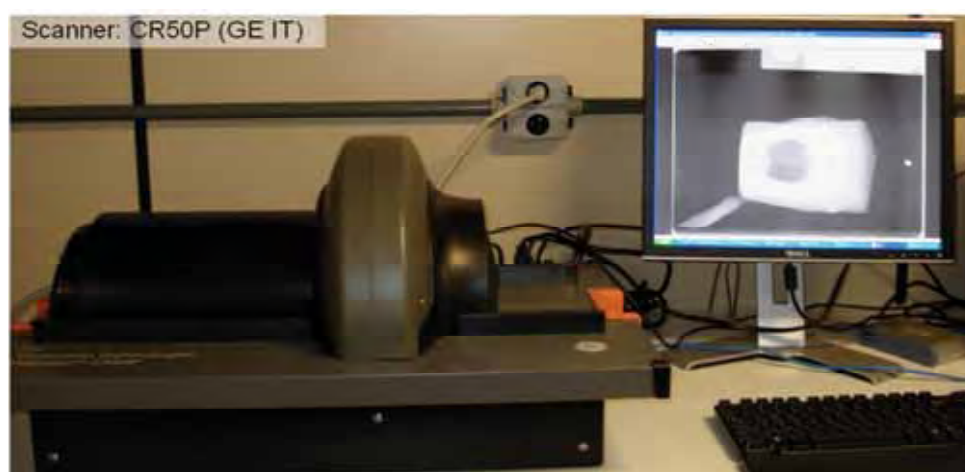


FIGURA 13 - SCANNER COM A IMAGEM RADIOGRÁFICA DIGITALIZADA DA BIOPSIA.

▪ **Processamento e análise histopatológicos**

Após a fixação das peças em formol 4% tamponado, seguiu-se à sua lavagem em água corrente (1 hora), imersão em solução desmineralizadora rápida de ossos (Allkimia, Brasil) por 48 horas, lavagem em água corrente (1 hora), desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico puro (VETEC, Brasil; 1 banho de 70%, 80%, 90% e 3 banhos de 100%, 1 hora cada), diafanização em 3 banhos de xilol puro (VETEC, Brasil) por 30 minutos cada, impregnação em 3 banhos de parafina líquida a 60°C (VETEC, Brasil) por 1 hora cada e inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE) (Figura 14). e examinados por um patologista, previamente treinado, em um estudo cego.



FIGURA 14 - PROCESSAMENTO HISTOLÓPATOLÓGICO

A análise descritiva comparativa intra e intergrupos da resposta biológica se baseou no tipo e na intensidade das alterações inflamatórias (alterações vasculares, infiltrado

inflamatório) e dos processos reparatórios (fibrose, proliferação angioblástica, aposição e reabsorção óssea e reabsorção do material). As imagens mais representativas dos fenômenos observados foram documentadas em um microscópio óptico FWL-1000 (Feldman Wild Leitz, Brasil) utilizando a câmera fotográfica acoplada Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Brasil).

▪ ***Análise histomorfométrica***

Foram utilizados os parâmetros descritos por Mandarim-de-Lacerda⁷⁸ (2003). A referência para contagem foi a imagem de maior extensão ou diâmetro do defeito crítico, correspondente a região central de cada peça, que foi capturada digitalmente com magnificação final de 170 x utilizando a câmera fotográfica Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Brasil). Para cada lâmina (referente a um animal por período experimental), foram obtidos campos contíguos não superpostos (6 a 8 por corte), que representam toda a área do defeito (de uma borda a outra), totalizando um total de 280 imagens avaliadas. As imagens foram inseridas no programa Image Pro-Plus 6.0 (MediaCybernetics, Estados Unidos), previamente calibrado em micrômetros/pixel, e em seguida feita superposição com uma grade contendo 100 pontos (Figura 15). Para cada imagem, foi determinado o número de pontos sobre o tecido conjuntivo, os vasos sanguíneos, o tecido ósseo neoformado, o tecido ósseo antigo, o biomaterial enxertado e outras estruturas que não se enquadrassem nessas definições.

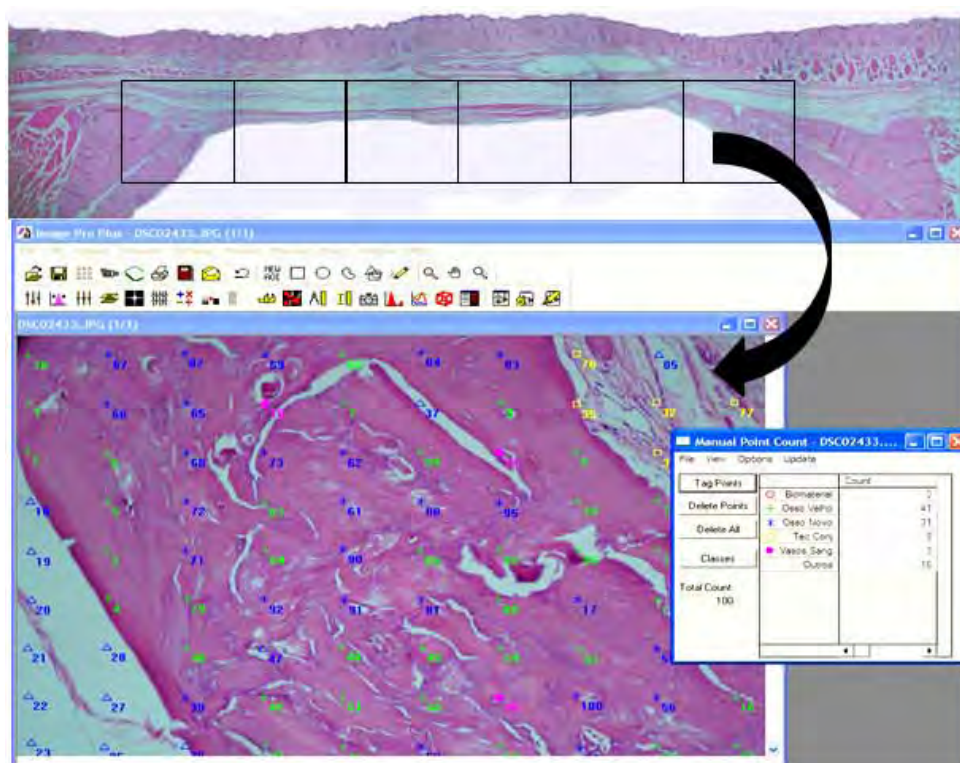


FIGURA 15 - O PROGRAMA IMAGE PRO-PLUS 6.0 COM A IMAGEM DOS CAMPOS CONTÍGUOS DA LÂMINA (170 X) COM A SUPERPOSIÇÃO DE UMA GRADE COM 100 PONTOS.

▪ **Análise estatística**

A contagem manual foi realizada por dois examinadores independentes e calibrados, num estudo cego, cuja variação máxima das médias foi inferior a 0,01% (paired *t* test, InStat versão 3.01, GraphPad Software, Estados Unidos). As médias e desvios padrão obtidas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) utilizando o mesmo programa, definindo diferenças significantes se $p < 0,05$ (teste de Tukey). Nos casos em que os desvios padrão dos grupos fossem significativamente diferentes, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (pós teste de Dun).



Resultado

RESULTADO

ESTUDO IN VITRO

Foi constatada pela análise morfológica a ocorrência de mudança fenotípica das células em cultura a partir de 14 dias de osteodiferenciação. Na fase inicial as células tinham um formato arredondado, com poucos dias de cultivo sua forma mudou para um aspecto fibroblastóide. Finalmente as células passaram a apresentar uma morfologia poliédrica ou cuboidal sugestiva da diferenciação das células osteoprogênitoras em fibroblastos.

Na análise bioquímica foram observadas mudanças no microambiente extracelular compatíveis com o processo de osteodiferenciação. Durante os períodos experimentais foi possível constatar no meio de cultura das células osteogênicas a atividade máxima inicial da enzima fosfatase alcalina em 7 dias decrescendo em 14 dias e seguindo o crescimento até 28 dias. A concentração de cálcio foi menor de forma significativa nos períodos de 14 e 28 dias quando comparado ao período de 7 dias. Porém observando a concentração de cálcio contido na matriz extracelular e células aderidas, houve presença significativa a partir dos 14 dias, seguindo-se um aumento progressivo até atingir um pico máximo em 28 dias (Figura 16).

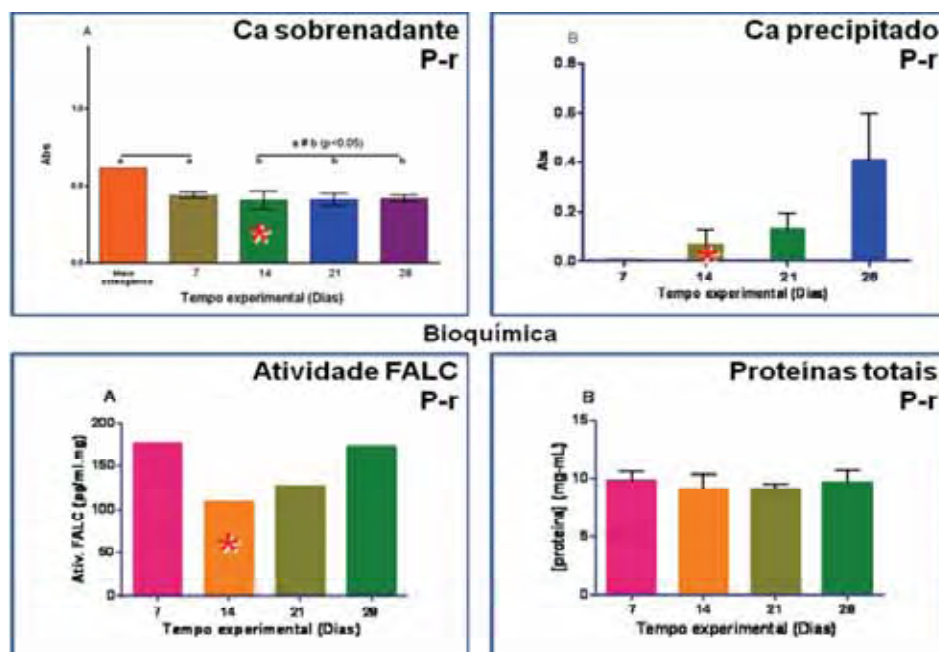


FIGURA 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA MOSTRANDO: O CÁLCIO SOBRENADANTE, O CÁLCIO PRECIPITADO A ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA E PROTEÍNAS TOTAIS.

A análise citoquímica mostrou a presença de nódulos de mineralização a partir de 21 dias de osteoindução (Figura 17A). Estas estruturas tinham um formato arredondado inicialmente, modificando em quantidade, tamanho e forma ao final do período de osteodiferenciação ou seja 28 dias (Figura 17B).

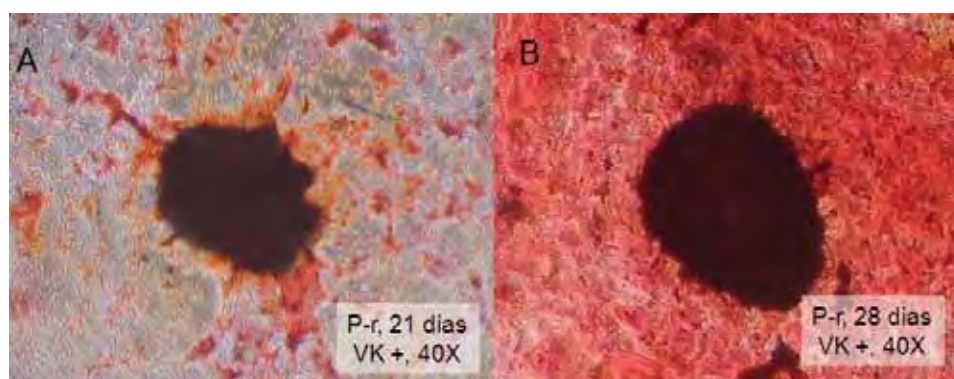


FIGURA 17 - NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO (VON KOSSA) COM 21 DIAS (A) E 28 DIAS(B).

A análise ultra-estrutural do conjunto xenoenxerto-células derivadas de periósteo após 6 dias de incubação demonstrou células em monocamada povoando parcialmente a superfície de grânulos de hidroxiapatita e fibras colágenas que compunham o material testado (Figura 18).

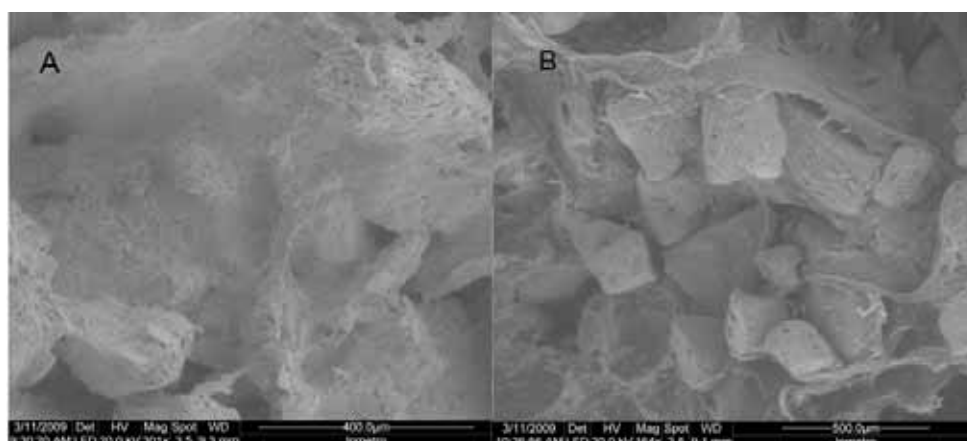


FIGURA 18 - ÁREAS CONFLUENTES (MATERIAL RECOBERTO COM CDPA), ÁREAS NÃO CONFLUENTES (MATERIAL NÃO RECOBERTO COM CDPA) 1000X.

ESTUDO IN VIVO

A análise radiográfica em 1 mês pós-enxertia evidenciou ausência de formação óssea central; no Grupo 1 (Figura 19A) observou-se alteração marginal do osso, sugerindo novo crescimento ósseo em direção ao centro do defeito, no Grupo 2 (Figura 19B) houve uma discreta formação óssea marginal lateral ao defeito com ausência de formação óssea central, no Grupo 3 (Figura 19C) o xenoenxerto era evidente e preenchia a área do defeito com radiopacidade distinta do osso antigo, de maneira similar ao Grupo 4 (Figura 19D). Em 3 meses era evidente no Grupo 1 (Figura 19E) o crescimento ósseo centrípeto, com margens ósseas mais bem definidas e radiopacas crescendo em direção ao interior do defeito, no Grupo 2 (Figura 19F) ocorreu uma discreta

formação óssea marginal ao defeito e aparente ausência de formação óssea na região central, que se encontra preenchida pelo enxerto autógeno radiopaco, nos Grupos 3 e 4 (Figuras 19G e 19H), o xenoenxerto (menos radiopaco que no período anterior) sugeriu uma maior integração à estrutura óssea marginal do defeito, comparado ao tempo experimental anterior.

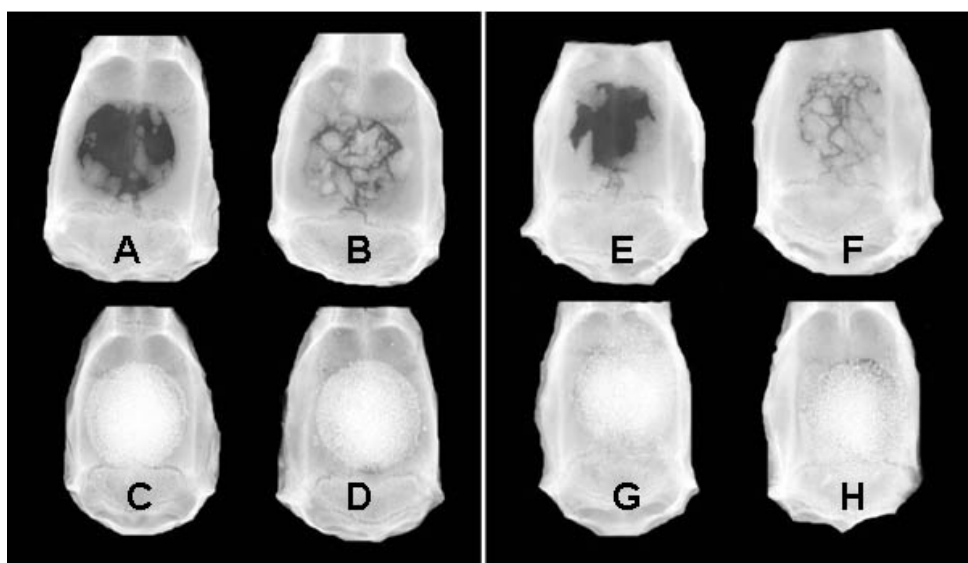


FIGURA 19 - ANÁLISE RADIOGRÁFICA. 1 MÊS: GRUPO 1 (A), GRUPO 2 (B), GRUPO 3 (C) E GRUPO 4 (D). 3 MESES: GRUPO 1 (E), GRUPO 2 (F), GRUPO 3 (G) E GRUPO 4 (H).

A análise histopatológica do centro do defeito crítico em 1 mês pós-enxertia mostrou no Grupo 1 (Figura 20A) a presença de tecido conjuntivo de frouxo a denso, envolvendo ilhotas de tecido ósseo originadas por ossificação intramembranosa, no Grupo 2 (Figura 20B), presença de fragmentos de osso antigo bem distintos, interpostos por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linhas de reversão indicando início da formação de osso novo, no Grupo 3 (Figura 20C), presença de grânulos de hidroxiapatita de diferentes dimensões permeados por tecido conjuntivo frouxo com intensidade moderada de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (CGMCE), revascularização e áreas sugestivas de ossificação

intramembranosa entremeando os grânulos de hidroxiapatita e no Grupo 4 (Figura 20D), notável celularidade entremeando os grânulos de hidroxiapatita, também circundados por discretas CGMCE. Em 3 meses, o Grupo 1 (Figura 20E), embora ainda preenchido por tecido conjuntivo, mostrou formação óssea intramembranosa amorfa ligeiramente maior que em 1 mês, no Grupo 2 (Figura 20F) fragmentos de osso autógeno já não se encontram individualizados, coalescendo através de remodelação e induzindo formação de novo osso, bem celularizado, em maior quantidade e com novos vasos sanguíneos, no Grupo 3 (Figura 20G) houve presença marcante de ossificação ao redor e em contato direto com os grânulos de hidroxiapatita, de intensidade leve a alta (fechamento quase completo do espaço referente ao material), de forma homogênea, embora o xenoenxerto também seja circundado por áreas de tecido conjuntivo denso com algumas CGMCE, enquanto o Grupo 4 (Figura 20H) exibiu algumas áreas com presença de CGMCE, em intensidade fraca a moderada, ao redor de grânulos do biomaterial, intercalado por tecido conjuntivo denso e com áreas focais ou heterogêneas de ossificação circundante à hidroxiapatita.

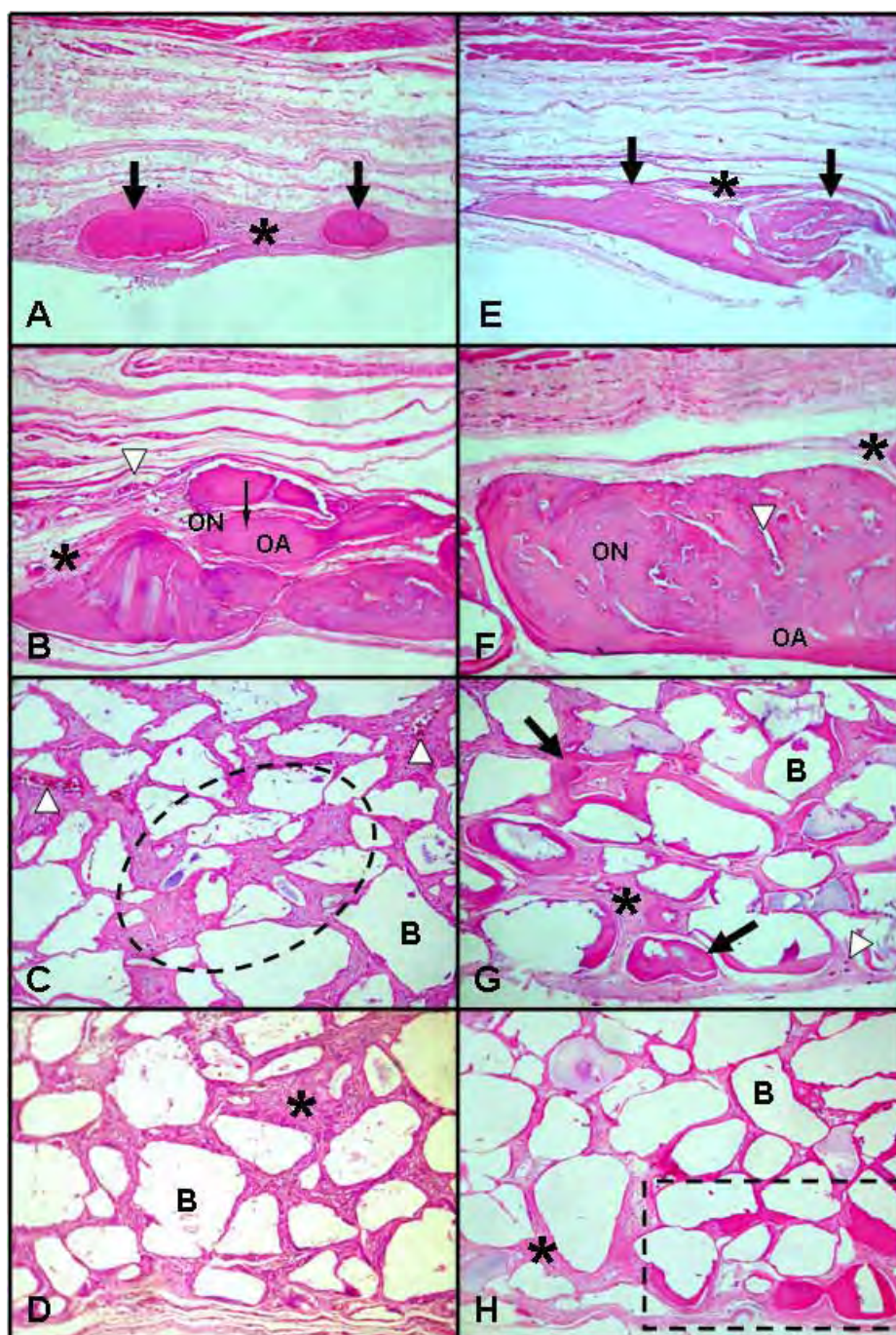


FIGURA 20 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA, EM 1 MÊS (A-G1, B-G2, C-G3 E D-G4) E 3 MESES (E-G1, F-G2, G-G3 E H-G4). TECIDO CONJUNTIVO (ASTERISCO), OSSO NEOFORMADO (SETA PRETA OU ON), OSSO ANTIGO (OA), LINHA DE REVERSÃO (SETA FINA), VASOS SANGÜÍNEOS (CABEÇA DE SETA BRANCA), BIOMATERIAL (B), ÁREAS DE OSSIFICAÇÃO

(TRACEJADO). COLORAÇÃO: HEMATOXILINA-EOSINA, AUMENTO: 170X.

As análises histomorfométrica e estatística demonstraram que a densidade média de volume de osso novo variou significativamente: do Grupo 2 em 30 dias ($8,25\% \pm 3,18$) para o Grupo 1 em 30 dias ($2,00\% \pm 1,16$, $p < 0,01$); do Grupo 2 em 90 dias ($10,94\% \pm 3,95$) para o Grupo 1 em 30 dias ($2,00\% \pm 1,16$, $p < 0,001$), o Grupo 1 em 90 dias ($4,62\% \pm 2,82$, $p < 0,01$), o Grupo 3 em 30 dias ($4,5\% \pm 1,49$, $p < 0,01$), o Grupo 4 em 30 dias ($3,54\% \pm 1,00$, $p < 0,001$) e o Grupo 4 em 90 dias ($5,11\% \pm 1,81$, $p < 0,01$); do Grupo 3 em 90 dias ($8,46\% \pm 1,07$) para o Grupo 1 em 30 dias ($2,00\% \pm 1,16\%$, $p < 0,01$) e o Grupo 4 em 30 dias ($3,54\% \pm 1,00$, $p < 0,05$). Isso indica que no tempo experimental mais tardio houve uma maior formação óssea com osso autógeno (Grupo 2), seguido por HA/Col (Grupo 3), enquanto o preenchimento com CDPA+HA/Col (Grupo 4) se assemelha ao efeito do coágulo sanguíneo (Grupo 1) (Figura 21B e Gráfico 1).

A densidade média de volume de novo tecido conjuntivo variou significativamente do Grupo 2 em 90 dias ($16,92\% \pm 5,39$) para o Grupo 3 ($28,98\% \pm 1,79$, $p < 0,05$) e o Grupo 4 ($28,89\% \pm 2,20$, $p < 0,05$) em 30 dias; isso poderia ser explicado pelo maior preenchimento da área do defeito pelo material, com espessura superior a encontrada nos Grupos 1 e 2 (Figura 21C e Gráfico 2). A densidade média de volume de vasos sanguíneos nos períodos de 1 mês e 3 meses não apresentou diferenças significantes entre os Grupos 1, 2, 3 e 4 (Figura 21D e Gráfico 3). A densidade média de biomaterial variou significativamente do Grupo 2 em 30 dias ($23,27\% \pm 10,65$) para o Grupo 3 ($44,56\% \pm 8,93$, $p < 0,05$) e o Grupo 4 ($47,53\% \pm 6,33$, $p < 0,01$) em 30 dias e do Grupo 2 em 90 dias ($24,16\% \pm 6,79$) para o Grupo 3 ($44,56\% \pm 8,93$, $p < 0,05$) e o Grupo 4 ($47,53\% \pm 6,33$, $p < 0,01$) em 30 dias; isto sugere que o osso autógeno (Grupo 2) e o xenoenxerto (Grupos 3 e 4) mantêm-se estáveis até 3 meses pós-enxertia, sem significativa degradação (Figura 21E e Gráfico 4).

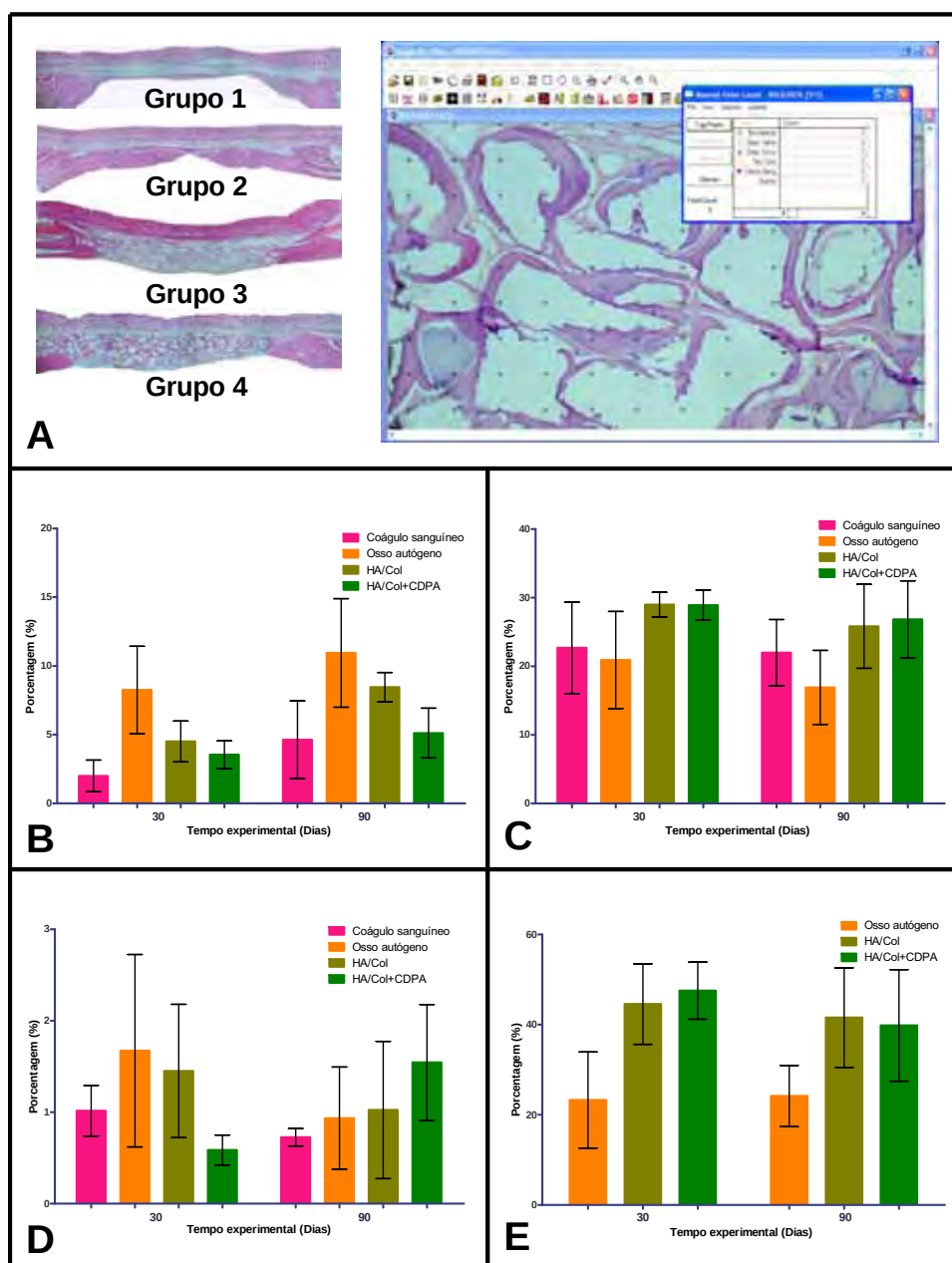


FIGURA 21 - ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA. GRÁFICOS COM A DENSIDADE MÉDIA DE VOLUME E DESVIO-PADRÃO DE ACORDO COM OS GRUPOS E OS TEMPOS EXPERIMENTAIS: OSSO NOVO (B),

TECIDO CONJUNTIVO NOVO (C), PRESENÇA DE VASOS SAGUÍNEOS (D) E BIOMATERIAL ENXERTADO (E).

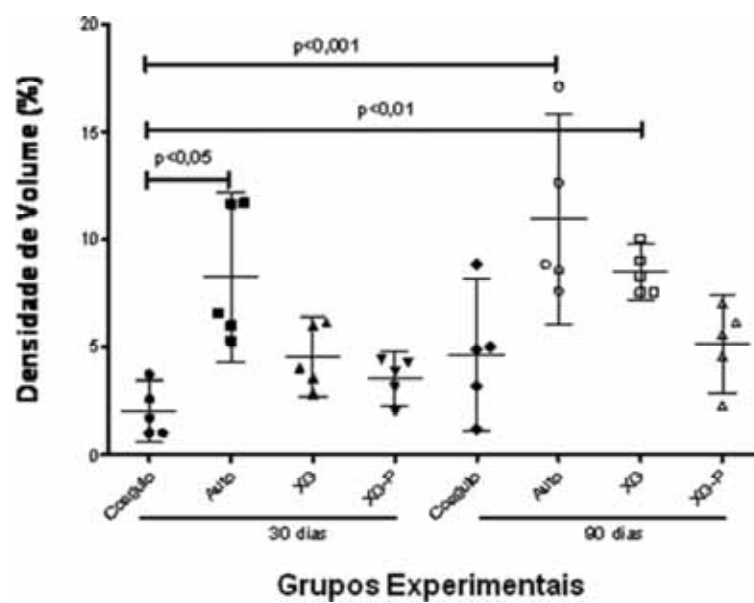


GRÁFICO 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: OSSO NOVO, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$.

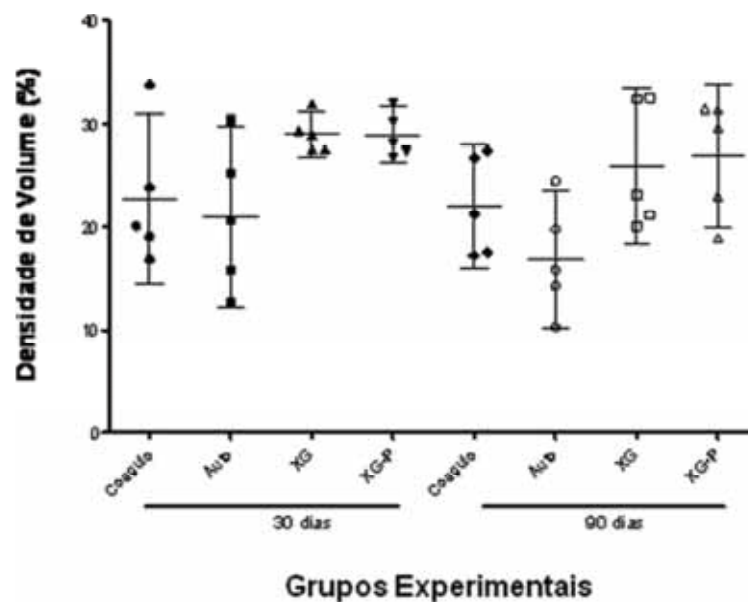


GRÁFICO 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: TECIDO CONJUNTIVO NOVO, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$.

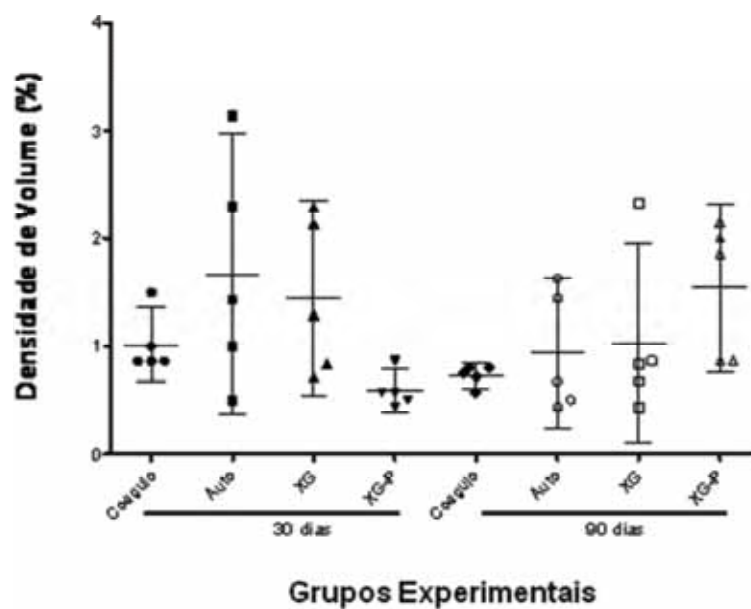


GRÁFICO 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: PRESENÇA DE VASOS SANGÜÍNEOS, CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$.

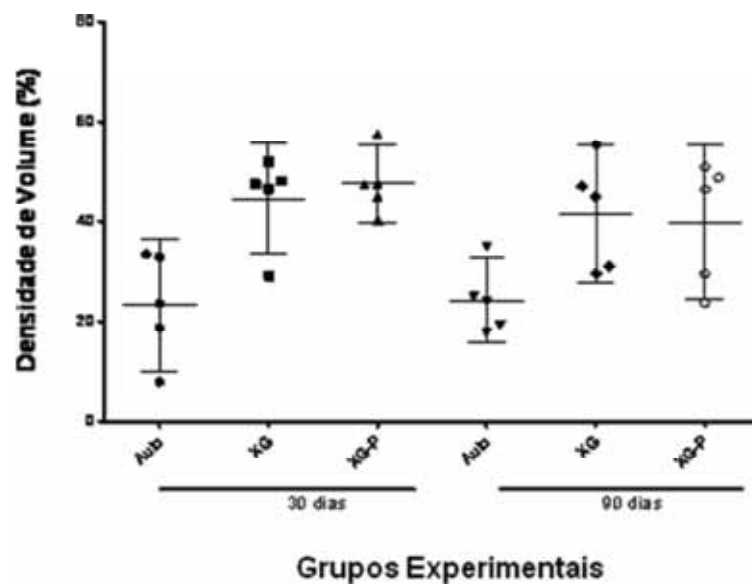


GRÁFICO 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA. GRÁFICO DE DISPERSÃO AVALIANDO O GRUPO E O TEMPO EXPERIMENTAL: BIOMATERIAL ENXERTADO ,CONSIDERANDO DIFERENÇAS SIGNIFICANTES SE $P < 0,05$.



Discussão

DISCUSSÃO

A obtenção e proliferação de culturas de células ósseas apresentam limitações, pois contam com uma inerente instabilidade e possibilidade de comportamentos aberrantes associados às diversas linhagens celulares. No caso das culturas primárias de osteoblastos, os sistemas apresentam uma mistura de células osteoblásticas em diferentes estágios de diferenciação além de possivelmente células de outras linhagens. Células bem diferenciadas são difíceis de expandir em cultura e muitas vezes perdem o potencial para diferenciação⁶⁵, células-tronco mesenquimais proliferam facilmente, mas direcioná-las para a diferenciação osteogênica é ainda o maior desafio⁹⁵ e co-culturas de células-tronco mesenquimais e osteoblastos mostram mineralização tardia e depósito de cálcio inferior ao das culturas isoladas, mostrando a pouca representatividade de suas interações sinérgicas⁹⁵. Embora as culturas tenham limitações, quando plaqueadas apropriadamente desenvolvem-se culminando na expressão de marcadores osteogênicos⁶¹.

O cultivo de células originadas de periósteo de ratos possui suas peculiaridades, em relação a tempo e a cuidados especiais de manutenção. Porém demonstrou-se possível de realizar de acordo com os procedimentos operacionais padrão do Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica da UFF, assim como induzir sua osteodiferenciação, objetivo maior deste estudo¹¹¹.

Além disso o periósteo tem um alto potencial de reparação³⁶.

Em comparação com as células embrionárias, as células osteoprogenitoras (células adultas) apresentam como vantagens: os aspectos legais e éticos não-limitantes de uso, facilidade para a coleta de material e uma técnica rápida e

cl clinicamente aplicável, não ficando restrita ao âmbito de pesquisa. Células-tronco mesenquimais adultas foram isoladas por Friedenstein, Petrakova⁴¹ (1966) e subsequentemente por outros investigadores, adotando a *nomina* de células plástico-aderentes ou unidades formadoras de colônia fibroblastóide (*colony-forming unit fibroblasts* ou *CFU-F*). Entretanto, embora as células osteocompetentes possam ser encontradas na medula óssea, sua proporção é extremamente baixa (0,001-0,01%)⁹¹ e decresce com a idade¹². Nesta condição, a célula entra em processo de senescência, isto é, uma paralisação irreversível da divisão celular, acompanhada pelo encurtamento de telômeros, o que restringe os mecanismos de regeneração tecidual¹¹⁰.

O suplemento básico que induz à osteodiferenciação em cultura de células estromais, composto pela associação Dexametazona – Ácido ascórbico – Beta-glicerofosfato (DAG), é bem descrito na literatura científica⁵⁷. Ácido ascórbico 2-fosfato (concentrações de 50µg/mL a 10mM) e beta-glicerofosfato (10µM a 10mM)¹¹¹ são já conhecidos indutores de osteoblastos, relacionando-se com depósito de matriz extracelular (colágeno I) e mineral, respectivamente¹⁰⁷. Dexametazona (10nM a 1µM), um glicocorticóide sintético, inclui mudanças morfológicas em células de formato alongado a cuboidal, aumentando a expressão de marcadores osteogênicos como fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina. Os efeitos da dexametazona na expressão de colágeno I são dependentes das condições de cultura e período⁸². Ela é necessária para a formação de nódulos de mineralização em culturas derivadas de estroma medular³², embora sozinha não consiga estimular in vitro a diferenciação de linhagens celulares com potencial osteogênico⁶⁷.

Os nódulos de Von Kossa são estruturas típicas dos processos de mineralização in vitro que são normalmente visualizados entre a terceira e quinta semana de cultivo pela técnica de Von Kossa que revela os minerais de cálcio como pontos negros estas estruturas tridimensionais, formadas por agregados

celulares associados à mineralização, apresentam tamanhos variados^{105,127}. A técnica de Von Kossa isoladamente não é um fator de confirmação de ossificação, porém é mais um fator que evidencia mineralização¹⁶.

Na osteogênese o colágeno I, pode ser detectado por dosagem⁹, imunomarcação^{74,78} ou PCR¹¹⁹.

Neste trabalho, a região anatômica escolhida para a obtenção do periósteo autógeno e confecção do defeito foi a calvária. A utilização da calvária para a realização de defeito de tamanho crítico deveu-se a sua pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Na díploe da calvária do rato, a presença do osso esponjoso entre as corticais é muito discreta. Além disso, embriológica e morfológicamente, a calvária desenvolve-se por ossificação intramembranosa, à semelhança dos ossos membranosos da face. Anatomicamente a calvária consiste de duas tábuas corticais que delimitam a região medular central, semelhante ao osso alveolar. Segundo Dupoirieux et al.³⁴, devido às características citadas, a calvária é o local de eleição para testes de biomateriais e de estudo de regeneração óssea guiada.

Muitos fatores devem ser levados em consideração na avaliação de estudos in vivo, como a quantidade e qualidade de osso formado num defeito ósseo, pois são influenciadas pela espécie e o tipo de animal utilizado no experimento, sua idade, a estabilidade do defeito, localização anatômica do defeito, tipo de osso, presença ou ausência de periósteo e da dura-máter^{44,64,108,113}.

A espécie *Rattus norvegicus albinus*, avaliada neste estudo, é muito utilizada em pesquisas e aceita na comunidade científica^{6,80,85,111,114}.

É importante lembrar que os resultados obtidos em modelos animais devem ser analisados com cuidado e não podem ser comparados diretamente com humanos, pois animais de pequeno porte para experimentação têm maior capacidade

regenerativa. Porém como Schmitz, Hollinger¹⁰⁸ (1986) recomendam, os testes de novos materiais de reparo ósseo devem seguir uma hierarquia de modelos animais antes de testes de fase I em humanos serem realizados.

Outro fator discutido na literatura é a localização de defeito na calvária. Neste trabalho, optou-se por realizar o defeito no centro da calvária por vários fatores, como: a não interferência da musculatura da orelha, a disponibilidade de grande área óssea e a grande facilidade para o manejo, realização do defeito e tomada radiográfica¹¹¹.

Apesar do acima exposto, convém salientar que existem pesquisadores que contra-indicam esta localização, devido ao risco de lesar durante a cirurgia a estrutura anatômica vascular existente abaixo da sutura sagital, e de introduzir o tecido conjuntivo proveniente da sutura na avaliação da regeneração óssea^{18,68}. Estes pesquisadores preconizam a realização de defeitos bilaterais em cada animal, o que permitiria uma análise pareada entre o defeito controle e o teste. Esse procedimento é contra-indicado porque defeitos bilaterais ficam muito próximos um do outro, podendo a reparação de um defeito interferir no contralateral e até mesmo haver a intercomunicação entre os defeitos por reabsorção da fina parede divisória e, conseqüentemente, a transformação em um único grande defeito, afetando os resultados do experimento^{28,68}.

O tipo de incisão usada na calvária é também um aspecto de discussão, já que deve: facilitar a visão do leito cirúrgico, gerar um retalho de fácil manejo, manter o periósteo íntegro, conter o material em experimentação no local e facilitar a sutura. No trabalho de Bosch et al.¹⁸ foi utilizada a incisão sobre a sutura sagital. Contudo, acredita-se que esse tipo de incisão seja contra-indicado, uma vez que a coaptação do retalho e do periósteo, dividido no meio pela incisão, fica no meio do defeito fazendo com que os dois processos de cicatrização, o do tegumento e o do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando a

interferência entre ambos e o desvirtuamento do processo de regeneração óssea. Devido a estas considerações, optou-se por realizar uma incisão em meia-lua¹¹¹, deixando o retalho e o perióstio íntegro sobre o defeito, fazendo com que a sutura fique a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material em experimentação.

Com relação ao defeito ósseo de tamanho crítico, Schmitz, Hollinger¹⁰⁸, definiram-no como um defeito cujas dimensões não permitem a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteogênico, osteoindutor ou osteocondutor seja colocado dentro ou sobre este defeito. Quando não tratados, são reparados com tecido conjuntivo frouxo a denso (como observado no Grupo 1 deste estudo), ocorrendo apenas pequena formação de tecido ósseo nas margens do defeito. Essa barreira fibroblástica pode ser derivada de prolapso do perióstio, fusão precoce de endo e pericrânio por rápida migração de fibroblastos ou incapacidade do hematoma no momento da injúria de se organizar e fechar o defeito com ausência de elementos osteogênicos^{28,108}.

O defeito de tamanho crítico em calvária aqui usado, atendeu aos requisitos descritos por Cardoso et al.²¹ (2006) e Costa et al.²⁷ (2009) para testes de regeneração óssea, ou seja: a) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito crítico ósseo, individualizado para a espécie; b) o sítio de implantação deve incluir preferencialmente osso cortical e medular; c) o defeito deve ser estável; d) o risco de fratura deve ser mínimo; e) o modelo animal deve permitir fácil acesso às análises radiográfica e histológica.

Existe uma discordância na literatura quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. Enquanto que para Dupoirieux et al.³⁴ estes são defeitos de 6 mm para outros autores os defeitos críticos são de 8 mm^{28,108,114}.

A definição do tamanho de uma lesão crítica é fundamental, pois pode comprometer a avaliação pretendida.

Dupoirieux et al.³⁴ (2001) relataram que três diferentes tipos de membranas não apresentaram diferenças significativas quanto ao reparo ósseo. Salientamos que em virtude do tamanho do defeito não crítico usado naquela pesquisa, os resultados tornam-se questionáveis devido à similaridade dos materiais ou à capacidade de reparação espontânea do tecido.

Por esta razão, foi utilizado no presente estudo o diâmetro de 8 mm em crânio de ratos, que demonstrou em todos os grupos analisados o fechamento incompleto do defeito crítico por novo osso (em análises radiográfica, histopatológica e histomorfométrica).

O reparo ósseo normal de defeito crítico em calvária de ratos pode variar de 7,6%²¹ a 10%⁷³ de preenchimento ósseo em 8 semanas e 12% em 12 semanas⁸³. A área esperada de novo osso usando biomateriais implantados em calvária de ratos pode variar de 15,8%²¹ a 40% em 8 semanas e de 24%⁸³ a 53,54%⁸⁸ em 12 semanas.

Períodos experimentais consistentes para análise de defeito crítico em calvária de ratos incluem 1 mês^{21,37,38,59,73,83,88,111} ou 2 meses²¹ pós cirurgia, mostrando reparo ósseo inicial, 3 meses^{37,38,50,83,88,111}, 6 meses^{37,38,59} ou 9 meses²⁷, evidenciando processo avançado de reparo com maior neoformação óssea, embora após 6 meses a quantidade de tecido ósseo neoformado não se modifique significativamente devido ao declínio da diferenciação de células osteoprogenitoras⁵⁰.

Tempos menores avaliam somente o processo inflamatório anterior ao reparo ósseo^{21,73,88,111}.

O sacrifício dos ratos ocorreu nos períodos de 30 e 90 dias para avaliar respectivamente o processo inflamatório, de reparo ósseo inicial e reparo ósseo tardio¹¹¹.

Existe uma grande variedade de biomateriais associados à terapia celular com a finalidade de bioengenharia óssea. Para orientar à melhor escolha, considera-se que um carreador ideal deva apresentar as seguintes características: a)

adaptabilidade à área do defeito; b) osteocondutividade, marcada por boa capacidade de adesão, proliferação e maturação das CTMA; c) capacidade de servir como barreira aos tecidos vizinhos; d) tempo de reabsorção compatível com o tempo requerido para formação óssea, porém não tão longo que interfira na substituição do material pelo osso³²; e) biocompatibilidade, não-imunogenicidade e atoxicidade; f) radioluscência, preferível para permitir que o novo osso seja distinguível radiograficamente do implante; g) facilidade na manufatura e esterilização; h) fácil manuseio durante ato cirúrgico, evitando procedimentos pré-operatórios que aumentam o risco de infecção; i) adequada microarquitetura, com interconexões e porosidades (200-900µm) que permitam tanto a penetração de células osteocompetentes quanto de células endoteliais, necessárias à vascularização do novo tecido em formação^{26,47,96}.

O uso de xenoenxerto acelular a base de hidroxiapatita e colágeno no tratamento de defeitos ósseos extensos associado a células derivadas de periósteo autógeno ainda é algo pouco estudado na literatura. A origem bovina do material mostra boa aceitação biológica quando testado em espécie receptora diversa, como o rato¹²¹. Quanto à composição do material, já vem sendo estudados separadamente o colágeno, isolado ou associado a fatores de crescimento¹¹⁸, e a hidroxiapatita, que nem sempre traz resultados favoráveis^{47,126}. Exata associação mostra-se então benéfica e representa uma nova alternativa terapêutica para promoção de reparo de defeitos ósseos extensos, destacando o potencial osteocondutivo do biomaterial^{4,119}.

Em relação aos riscos de transmissão de prions pelo material biológico (xenógeno bovino) pode ser considerado de risco praticamente inexistente, já que a hidroxiapatita é submetida a altas temperaturas (>1100° C por 3 horas). Além disto, o colágeno é extraído de gado rastreado, proveniente de área geográfica de baixo risco (sem relatos de ocorrência de encefalopatias

espongiformes). Outro ponto de relevância é que a extração dos materiais nos tecidos bovinos ocorre em áreas de baixo risco: ossos e tendões⁹²

Embora a radiografia digital apresente maior definição devido à sua alta sensibilidade^{94,102} se comparada com a convencional^{50,80,81,94,103}, não foi possível quantificar o volume de osso neoformado devido à sua indistinção da radiopacidade do material implantado. Novas ferramentas imaginológicas podem ser testadas no intuito de promover maior acurácia à avaliação.

Em análise histopatológica, a presença de células gigantes multinucleares do tipo corpo estranho na interface do material em 4 semanas ou 1 mês pós-implantação corrobora a literatura. Macrófagos e células gigantes de corpo estranho são responsáveis pela degradação do biomaterial, visto que macrófagos são capazes de fagocitar partículas muito pequenas (<5µm) enquanto partículas maiores (>10µm) induzem formação de células gigantes de corpo estranho. Estes dois tipos celulares sobre a superfície de um biomaterial também são importantes por controlarem o remodelamento de matriz extracelular, afetando a performance do material. Isto se dá através da secreção de citocinas inflamatórias, que tanto influenciam no comportamento de outros leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) quanto nas células reparativas (fibroblastos, ceratinócitos, células endoteliais)⁶.

Com relação a formação óssea, melhor resultado histológico foi encontrado com enxertia de osso autógeno; este dado, no que concerne a avaliação das terapias para perdas ósseas severas, corrobora que o osso autógeno ainda representa o padrão ouro de reparo^{17,76,87}.

A literatura tem mostrado alguns resultados positivos em terapia celular utilizando perióstee para perdas ósseas severas. Em ratos, perióstee autógeno estimulado em cirurgia prévia utilizado como um enxerto livre em região de calvária mostrou bons resultados no reparo ósseo⁶⁰. O enxerto em calvária da associação

de células derivadas de periósteo mandibular humano e esponja colágena alcançou valores significativos de neoformação óssea (59,9%) se comparado ao grupo controle (9,5%), mostrando ser possível a osteoindução em modelo animal xenogênico¹⁰³. Em coelhos, células derivadas de periósteo semeadas sobre implantes de ácido poliglicólico e enxertadas em defeito crítico de calvária mostram em 12 semanas de pós-operatório o triplo da capacidade de formação de novo osso que o grupo não-tratado e quase o dobro que o carreador sozinho¹⁹. Quando estas células são carreadas em ácido polilático glicólico e gel de fibrina, mostram reparo parcial no defeito com intensa formação de osso não calcificado nas margens ósseas e regiões centrais do defeito em 4 semanas, havendo fechamento do defeito em 65%, bem superior aos grupos de enxerto sem células (31%) e controle (22%)⁹⁵.

Entretanto, a bioengenharia de tecidos não mostra sempre resultados favoráveis, como observado no presente estudo. Células estromais de medula óssea humana, quando carreadas, osteoinduzidas em matriz tridimensional de hidroxiapatita e implantadas ectopicamente não mostraram formação óssea em todas as amostras (8 casos de osteogênese em 14) após 6 semanas, ocorrendo nos casos de osteogênese grande variabilidade de acordo com o doador, de pequena (10%) a significativa (50%) quantidade de tecido ósseo de novo formado⁸². O potencial osteogênico de células derivadas de periósteo pode sofrer distinção interespecífica, pois coelhos apresentam crescimento mais rápido in vitro, embora em sítio ectópico (subcutâneo de camundongos atímicos, in vivo), somente células humanas sejam eficazes em gerar osso quando conjugadas a um carreador colágeno³⁵. Células mesenquimais que, embora osteocompetentes sob indução e aderentes a um carreador colágeno de submucosa intestinal suína, não mostraram maior osteogênese em calvária de ratos do que o material sozinho, não servindo para a função de terapia celular⁶⁴.

A formação óssea in vivo é um processo complexo influenciado por diversos fatores incluindo o biomaterial carreador, os parâmetros dependentes do hospedeiro e o comportamento das células doadoras em relação ao seu potencial osteogênico^{49,62}. E também como mostra este estudo, das interações entre todos estes fatores ainda não totalmente compreendidos.

Alguns materiais de enxertia híbridos tridimensionais (Scaffolds) ao serem utilizados no reparo de perdas ósseas associados a culturas de células osteoprogenitoras não tiveram um resultado positivo por falta de uma melhor adesão dos osteoblastos ao biomaterial, como relatam Rosa et al.¹⁰⁰ (2008) em um trabalho de revisão confirmando resultados de Anselme⁷ (2000).

As propriedades potencialmente benéficas do compósito HA/Col são confirmadas através da osteogênese próxima à obtida com osso autógeno. Entretanto, quando usada a bioengenharia tecidual, não se verificou ganho ósseo significativo usando CDPA se comparadas ao coágulo sanguíneo. Isso poderia ser explicado em função do tipo de material escolhido para a pesquisa não ser favorável como carreador de células, não permitindo adesão focal suficiente dentro do período experimental proposto. A topografia de superfície do biomaterial tem importância na diferenciação celular, como se demonstra em hidroxiapatitas com diferentes topografias onde os eventos celulares iniciais (adesão em 2 horas) não são interferidos, embora a capacidade de proliferação, a síntese protéica, a atividade de fosfatase alcalina e a presença de nódulos de mineralização sejam favorecidas por HA com superfícies mais regulares⁹⁹. De forma similar, o contato a longo prazo (6 meses) de células derivadas de osso trabecular com osso bovino anorgânico enxertado em maxilas humanas mostrou não afetar in vitro a viabilidade e a adesão celular, mas foi capaz de interferir negativamente na expressão do fenótipo osteoblastóide, diminuindo osteogênese em comparação ao grupo controle/sem enxertia prévia à biópsia óssea¹¹.

Dessa forma, o periosteio constitui uma vantajosa fonte de células para bioengenharia tecidual com mínima manipulação ex vivo desde que combinado à um adequado carreador para acelerar e/ou aumentar a formação óssea em casos de perdas ósseas severas e não piore a performance do carreador durante o período de reparo ósseo^{19,48}.

A engenharia tecidual usando células de periosteio teria como grande vantagem a necessidade de pequenas quantidades de tecido do paciente obtidas por meio de técnicas pouco invasivas e mais seguras do que os métodos convencionais. Poderia ser usada por dentistas como terapia regenerativa de osso alveolar, indicada em casos de periodontites e implantes dentais, devido a sua fácil manipulação, expansão em laboratório e reimplante em fase de mineralização inicial no próprio paciente, sendo mais fácil coletar células do periosteio mandibular durante uma cirurgia oral de rotina do que de aspirado de medula óssea^{2,107}.



Conclusão

CONCLUSÃO

O presente trabalho permite concluir que é possível obter, cultivar e semear células derivadas de periósteo, as quais foram capazes de aderir sobre o xenoenxerto bovino composto por hidroxiapatita e colágeno I. Embora o compósito testado em defeito crítico de calvária de ratos mostre biocompatibilidade e osteocondução, o biomaterial livre das células derivadas de periósteo se mostrou mais eficaz na formação de novo osso do que o uso de bioengenharia tecidual.



Referências

REFERÊNCIAS*

1. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003; 424: 870-2.
2. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, et al. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J Dent Res*. 2007; 86: 79-83.
3. Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair and Regeneration*. 2004; 12: 252-9.
4. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001; 10: S96-101.
5. Allen DG. *Handbook of veterinary drugs*. Philadelphia: Lippincott; 1998. p. 616-7.
6. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008; 20: 86-100.
7. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; 21: 667-81.
8. Arinzeh T L, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005; 26: 3631-8.
9. Arnold U, Lindenhayn K, Perka C. In vitro-cultivation of human periosteumderived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials*. 2002; 23: 2303-10.
10. Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:1209-21.

11. Beloti MM, Martins Jr. W, Xavier SP, Rosa AL. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19: 48-54.
12. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials.* 2003; 24: 2497-502,.
13. Ber S, Torun KG, Hasirci V. Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials.* 2005; 26: 1977-86.
14. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004; 22: 625-34.
15. Biomet. Biomet Annual Report. 4-5. 2004. Indiana (USA). Ref Type: Report.
16. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, et al. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72: 537-47.
17. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K-I, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg.* 2002; 13: 231-9.
18. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998; 9: 310-6.
19. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 101: 567-74.
20. Cahill RA, Jones OY, Klemperer M, Steele A, Mueller TO, El-Badri N. Replacement of recipient stromal/mesenchymal cells

after bone marrow transplantation using bone fragments and cultured osteoblast-like cells. *BiolBlood Marrow Transplant.* 2004; 10: 709-17.

21. Cardoso AK, Barbosa Jr. AA, Miguel FB, Marcantonio Jr. E, Farina M, Soares GD, et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs.* 2006; 184: 128-37.
22. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25: 2739-49.
23. Chang Y-J, Tseng CP, Hsu LF, Hsieh TB, Hwang SM (a). Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 495-9.
24. Chen F, Zhou Y, Barnabas ST, Woodruff MA, Hutmacher DW. Engineering tubular bone constructs. *J Biomech.* 2007; 40: S73-9.
25. Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H. Characterization of human bone cells derived from the maxillary alveolar ridge. *Clin Oral Impl Res.* 2006; 17: 533-40.
26. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 2000; 21: 1095-102.
27. Costa NMF, Melo BR, Brito RT, Fernandes GVO, Bernardo VG, Fonseca EC. Techniques to study cellular response in critical size bone defect healing on rat calvaria treated with hydroxyapatite implants. *Key Eng Mater.* 2009; 396-8: 285-8.
28. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74: 487-91.

29. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 1115-22.
30. Davies JE, Hosseini M. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE, ed. *Bone engineering*. Toronto: Em Square; 2001. p. 1–14.
31. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999; 107: 275-81.
32. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 64-73.
33. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289: 1501-4.
34. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30: 58-62.
35. Eyckmans J, Luyten FP. Species specificity of ectopic bone formation using periosteum-derived mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng.* 2006; 12: 2203-13.
36. Eyre-Brook AL. The periosteum: Its function reassessed. *Clin Orthop Relat Res.* 1984; 189: 300-7.
37. Fernandes GVO, Calasans-Maia M, Mitri FF, Bernardo VG, Rossi A, Almeida GDS, et al. Histomorphometric analysis of bone repair in critical size defect in rats calvaria Treated with

Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. *Key Eng Mater.* 2009; 396-8: 15-8.

38. Ferreira GR, Cestari TM, Granjeiro JM, Taga R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. *Braz Dent J.* 2004; 15: 175-80.
39. Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, Barbieri O, et al. Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice. *Bone.* 2002; 30: 718-25.
40. Freshney RI. *Culture of animal cells. a manual of basic technique.* 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2000.
41. Friedenstein AJPSI, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16: 381-90.
42. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells.* 2004; 22: 649-58.
43. Garcia-Castro J, Balas A, Ramirez M, Perez-Martinez A, Madero L, Gonzalez-Vicent M, et al. Mesenchymal stem cells are of recipient origin in pediatric transplantations using umbilical cord blood, peripheral blood, or bone marrow. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007; 29: 388-92.
44. Gosain A K, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Matloub HS. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 515-27.
45. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 1463-73.

46. Habibovic P, Kruyt MC, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res*. 2008; 26: 1363-70.
47. Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA, van Blitterswijk CA, de GK. Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77: 747-62.
48. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int*. 2008; 82: 238-47.
49. Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, Muller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*. 2007; 28: 1152-62.
50. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis*. 2008; 14: 457-64.
51. Horwitz EM, Prockop DW, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999; 5: 309-13.
52. Hutmacher DW, Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003; 9: S45-64.
53. Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, et al. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 342: 1257-62.
54. Jäger M, Krauspe R. Antigen expression of cord blood derived stem cells under osteogenic stimulation in vitro. *Cell Biol Int*. 2007; 31: 950-7.

55. Jäger M, Sager M, Knipper A, Degistirici O, Fisher J, Kogler G, et al. [In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells]. *Orthopade*. 2004; 33: 1361-72.
56. Jaquiere C, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer HF, et al. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann Surg*. 2005; 242: 859-67, discussion 867-8.
57. Jorgensen NR, Henriksen Z, Sorensen OH, Civitelli R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids*. 2004; 69: 219-26.
58. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, et al. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone*. 2004; 34: 993-1003.
59. Kamakura S, Sasano Y, Homma H, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K. Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair. *J Dent Res*. 1999; 78: 1682-7.
60. Kanou M, Ueno T, Kagawa T, Fujii T, Sakata Y, Ishida N, et al. Osteogenic potential of primed periosteum graft in the rat calvarial model. *Ann Plast Surg*. 2005; 54: 71-8.
61. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 228: 79-102.
62. Kasten P, Luginbuhl R, Vogel J. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable

- calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials*. 2005; 26: 5879-89.
63. Katchburian E, Arana V. Tecidos mineralizados. In: Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas*. São Paulo: Panamericana; 1999. p.23-38.
 64. Keskin M, Kelly CP, Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122: 400-9.
 65. Kim H, Lee JH, Suh H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J*. 2003; 44: 187-97.
 66. Kim JW, Kim SY, Park SY. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol*. 2004; 83: 733-8.
 67. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y , Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*. 2004; 28: 33-9.
 68. Krebsbach PH, Paul H, Mankani R, Mahesh H. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 1998; 66: 1272-8.
 69. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005; 20: 1394-402.
 70. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, De Rosa A. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006; 17: 511-5.
 71. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920-6.

72. Lecoœur L, Ouhayoun JP. In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells. *Biomaterials*. 1997; 18: 989-93.
73. Lee BH, Kim MC, Cho SH, Lee Y-K. Amorphous calcium polyphosphate bone regenerative materials based on calcium phosphate glass. *Key Eng Mater*. 2009; 396-8: 209-12.
74. Lu F-Z, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Shimizu-Saito K, Hara Y. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J Lab Clin Med*. 2005; 146: 271-8.
75. Mackie E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 1301-5.
76. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvaria defects. *Eur J Orthod*. 2004; 26: 475-82.
77. Majeska RJ. Culture of osteoblastic cells. *Principles of Bone Biology*. New York: Academic Press; 1996. p. 1229-37.
78. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003; 75: 469-86.
79. Markes SC, Hermey DC Principles of bone biology. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA The structure and development of bone. New York: Academic Press. 1996. p. 3-14.
80. Marins LV, Cestari TM, Sottovia A.D., Granjeiro J.M., Taga R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. *J Appl Oral Sci*. 2004; 21: 62-9.
81. Marzouk KM, Gamal AY, Al-Awady AA, Sharawy MM. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65: 1508-16.

82. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Both S, Oner FC, van Blitterswijk CA, et al. Relation between in vitro and in vivo osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15: 1123-8.
83. Messori MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 723-9.
84. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 5807-12.
85. Nefussi J R, Bami G, Modrowski D, Obouf M, Forest N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvária osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45: 493-503.
86. Nerem RM. Tissue engineering in the USA. *Med Biol Eng Comput*. 1992; 30: CE8-12.
87. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 269-91.
88. Oliveira RC, Oliveira FH, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19: 749-54.
89. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 94: 549-55.
90. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*. 2000; 21: 1145-53.

91. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-7.
92. Prakash B. Sterilization of prions. Agents of transmissible degenerative encephalopathies. *Bull Hosp Infect Soc India*. 1996; 1: 23-4.
93. Prele CM, Horton MA, Caterina P, Stenbeck G. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp Cell Res*. 2003; 282: 24-34.
94. Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 455-60.
95. Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Haupl T, Burmester GR, et al. Sittering, M. Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *J Mater Sci Mater Med*. 1999; 10: 767-72.
96. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*. 1996; 17: 31-5.
97. Rodrigues CV, Serricella P, Linhares AB, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003; 24: 4987-97.
98. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; 21: 105-10.
99. Rosa AL, Beloti MM, van NR. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. *Dent Mater*. 2003; 19: 768-72.
100. Rosa AL, Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous Scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2008; 5: 719-28.

101. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72: 135-42.
102. Rowlands JA. The physics of computed radiography. *Phys Med Biol.* 2002; 47: R123-66.
103. Sakata Y, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Yamachika E, et al. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells - a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006; 34: 461-5.
104. Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CX, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, et al. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng.* 2003; 9:S127-39.
105. Schecroun N, Dellove C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells comparative study and characterization. *Bone.* 2003; 32: 252-60.
106. Schliephake H, Tavassol F, Gelinsky M, Dard M, Sewing A, Pompe W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 112-8.
107. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittinger M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2003; 31: 34-9.
108. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 299-308.
109. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int.* 2007; 80: 294-300.

110. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006; 5: 91-116.
111. Silva IIC, Pimentel-Soares S, Bittencourt RC, Granjeiro JM. Natural bovine anorganic apatite and collagen presents osteoconductivity and contribute to bone repair of rat calvaria critical size defect. *Key Eng Mater.* 2009; 396-8: 249-52.
112. Simon TM, Van S, Kunishima DH, Jackson DW. Cambium cell stimulation from surgical release of the periosteum. *J Orthop Res.* 2003; 21: 470-80.
113. Taga MLL. Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (*Cavia Porcellus*). [dissertação de mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.
114. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg.* 1982; 196: 100-9.
115. Takushima A, Kitano Y, Harii K. Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res.* 1998; 78: 68-77.
116. Thoms M. The quantum efficiency of radiographic imaging with image plates. *Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 1996; 378: 598-611.
117. Tian XF, Heng BC, Ge Z, Lu K, Rufaihah AJ, Fan VT, et al. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008; 68: 58-67.
118. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 2003; 21: 681-93.

119. Turhani D, Watzinger E, Weissenbock M, Yerit K, Cviki B, Thurnher D, et al. Three-dimensional composites manufactured with human mesenchymal cambial layer precursor cells as an alternative for sinus floor augmentation: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16: 417-24.
120. Urist MR, Mclean FC. Recent advances in the physiology of bone. Part I. *J Bone Joint Surg (Am).* 1963; 45: 1305-13. Apud Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty: an experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74: 487-91.
121. Vidal BC. The use of a complex of collagen type I with hydroxyapatite from bone, as a bone implant substitute: an experimental approach. *Tissue Eng.* 1996; 2: 151-60.
122. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005; 33: 1402-16.
123. Wu B, Zheng Q, Guo X, Wu Y, Wang Y, Cui F. Preparation and ectopic osteogenesis in vivo of scaffold based on mineralized recombinant human-like collagen loaded with synthetic BMP-2-derived peptide. *Biomed Mater.* 2008; 3: 44111.
124. Wu YC, Shaw SY, Lin HR, Lee TM, Yang CY. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials.* 2006; 27: 896-904.
125. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007; 327: 449-62.
126. Yuan H, Yang Z, Li Y, Zhang X, de Bruijn JD, de GK. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.* 1998; 9: 723-6.

127. Zheng YX, Ringe J, Liang Z, Loch A, Chen L, Sittertinger M. Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneic serum. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006; 7: 817-24.
128. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101: 164-9.



Anexos

ANEXO 1

APROVAÇÃO DO CHEFE DO LABORATÓRIO ONDE SERÁ REALIZADA A PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO
NÚCLEO DE TERAPIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOENGENHARIA,
BIOMATERIAIS E MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA



Niterói, 25 de março de 2008.

Eu, José Mauro Granjeiro, autorizo a realização de experimentos neste laboratório referentes a tese de doutorado "Terapia celular de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células-tronco mesenquimais adultas de periósteo autógeno" a ser desenvolvida pelo Sr. Anderson de Oliveira Paulo.

Atenciosamente, subscrevo-me com votos de estima,

José Mauro Granjeiro
Professor Adjunto de Bioquímica
Matrícula SIAPE: 1478192
Tel: (0xx21) 2629-9952 ou 2629-2324
E-mail: jmgranjeiro@gmail.com

ANEXO 2**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ESTUDO
COM ANIMAIS**

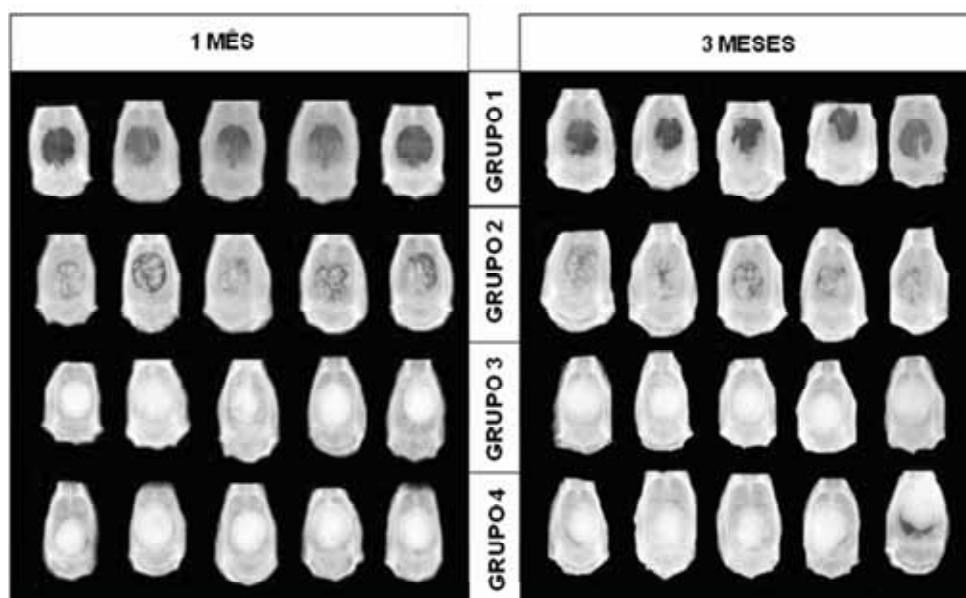
Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Certificamos que o projeto nº 004/07, intitulado “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMAIS DE PERIÓSTEO DE RATOS NA TERAPIA DE PERDAS ÓSSEAS” sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (pesquisador responsável) do DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em dezenove de dezembro de 2007.

Niterói, 05 de janeiro de 2008.

Presidente do CEPA

Dr. José Mauro Granjeiro
Diretor de Ensino de
Ciências da Saúde

ANEXO 3**Radiografias digitais**

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 04 de agosto de 2009.

ANDERSON DE OLIVEIRA PAULO