

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO

**O PAPEL DE UM ARCABOUÇO DE OSSO ALÓGENO E  
DE UM MEIO DE CULTURA NA OSTEOGÊNESE DE  
CÉLULAS TRONCO ADULTAS DA MEDULA ÓSSEA  
HUMANA**

por

**RAPHAEL CARLOS DRUMOND LORO**

Porto Alegre, julho de 2009

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO

**O PAPEL DE UM ARCABOUÇO DE OSSO ALÓGENO E  
DE UM MEIO DE CULTURA NA OSTEOGÊNESE DE  
CÉLULAS TRONCO ADULTAS DA MEDULA ÓSSEA  
HUMANA**

**RAPHAEL CARLOS DRUMOND LORO**

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Odontologia, área de  
concentração em Cirurgia e  
Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre, julho de 2009

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

L875e Loro, Raphael Carlos Drumond

O Papel de um Arcabouço de Osso Alógeno e de um Meio de Cultura na Osteogênese de Células Tronco Adultas da Medula Óssea Humana / Raphael Carlos Drumond Loro. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

xxiii, 96f.: il. gráf. tab.

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Denise Cantarelli Machado.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em CTBMF

1. OSTEOGÊNESE. 2. CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA. 3. TRANSPLANTE HOMÓLOGO. 4. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. 5. MEDULA ÓSSEA/crescimento e desenvolvimento. 6. REGENERAÇÃO ÓSSEA. 7. HUMANOS. 8. IN VITRO. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 612.492

C.D.U. 611-018.4:616.716(043.2)

N.L.M. WE 200

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia  
Bibliotecária CRB10/196

**DEDICATÓRIA**

## **A ti meu pai amado...**

### **Que falta me faz...**

Entre as árvores da lavoura, ouvindo no radinho a pilha sobre o carrinho de mão o jogo do colorado, atravessando uma cerca, plantando uma noqueira, limpando uma vertente, caminhando pelo mato, sentindo o cheiro das flores de laranjeira, fazendo uma valeta ou discando com o trator, carpindo uma mangueira ou matando formigas ao lado do Companheiro, Infante e Luana, andando de Jeep pela Granja, pescando na Estância Minuano, jogando futebol ou fazendo um churrasco em frente ao morro...estás sempre presente comigo. Descendo pelo capim alto de Dom Feliciano, indo e voltando de lá, comendo pinhão em frente à lareira ou comemorando um gol do Inter...estás sempre comigo.

Caminhando pelos corredores da faculdade, nos ambulatórios e no bloco cirúrgico... estás sempre comigo. Nas festas, nas viagens, no consultório, em casa... estás sempre comigo.

Pai amado, agradeço a Deus por ter vivido intensamente 27 anos da minha vida junto a ti, agradeço pelo nosso amor, pela grande amizade, pelo companheirismo, pelo exemplo de homem que fostes e por essa energia tão forte e bela que nos une a cada dia.

Dedico esse trabalho a ti meu pai, meu mestre, meu eterno e grande amigo.

Teu filho, Raphael.

## **AGRADECIMENTOS**

# AGRADECIMENTOS

---

A **Deus** por me proporcionar dia a dia a vida que tenho, por ter saúde, por ser feliz, por ter uma família e uma esposa maravilhosas e por estar terminando com êxito mais essa etapa da minha vida profissional.

A **Thêmis Thomé Loro**, minha amada esposa, grande companheira e fonte de luz e inspiração para viver a vida com alegria, pela paciência, pelo apoio, incentivo e carinho recebidos durante o curso. És muito especial, te amo muito.

A **minha querida e amada mãe Stella Maria Drumond Loro**, pelo amor eterno e grandioso que nos une a cada segundo de minha vida. Pelo carinho, grande amizade e companheirismo. Pelos conselhos, constante incentivo, apoio, paciência e preocupação. Por confiar e acreditar no meu potencial e no meu trabalho.

A toda a minha família, em especial, às minhas queridas irmãs **Christine e Stella** pelo amor, amizade, incentivo e paciência; aos meus avós **Yeddo e Betinha** e ao meu **tio Antônio**, pelo carinho, amizade e constante incentivo a tudo que me propus nesta jornada.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, pela qual tenho imenso apreço e admiração, na pessoa de seu **Magnífico Reitor, Prof. Dr. Irmão Joaquin Clotet**, e ao seu **Vice-Reitor, Prof. Dr. Irmão Evilazio Teixeira** por haverem me proporcionado um qualificado e respeitado ambiente de estudo, aprendizado e docência há mais de treze anos.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, minha segunda casa, na pessoa de seu **Diretor, Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, sua **Vice-Diretora, Profa. Dra. Angélica Fritcher**, dos demais **professores e funcionários**, pelo constante apoio ao curso de CTBMF e aos seus alunos de pós-graduação dentre os quais me incluo.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Poli Figueiredo**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da F.O da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelo apoio, conselhos, incentivo e auxílio durante o curso.

A **Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado**, Chefe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS, minha orientadora, pelo apoio incondicional, grande incentivo, pela confiança, pelo espaço e atenção concedidas na execução deste experimento durante estes anos de estudo. Por sua imprescindível e inestimável colaboração para o êxito desta pesquisa.

A **Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira** pela amizade e pelo grande apoio, incentivo, conselhos, preocupação e ajuda na execução e finalização do meu doutorado.

A todos os **professores do Programa do Curso de Doutorado em CTBMF da PUCRS** por contribuírem imensamente na minha formação profissional e docente durante o curso.

A **Profa. Dra. Daniela Nascimento Silva e ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho** pela atenção e inestimável ajuda na execução e término desse trabalho.

Ao **Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS** e ao seu **Laboratório de Biologia Celular e Molecular** por apoiarem e incentivarem trabalhos de pesquisa, em especial por terem proporcionado a realização de meu experimento sob excelentes e qualificadas condições de trabalho.

Aos grandes amigos e colegas **Prof. Dr. Roberto Fernandes Carvalho e Silva e Tomas Geremia**, pela compreensão e apoio irrestrito.

A **Profa. Dra. Luciana Hirakata** pela ajuda importante e o tempo disponibilizado para a execução dessa tese.

A **Profa. Dra. Maria Emilia Engers** pela ajuda importante e o tempo disponibilizado para a finalização da tese.

Ao prezado **Christian Viezzer**, pelo apoio, dedicação, incansável e imprescindível ajuda durante a execução e aprimoramento deste experimento.

À amiga **Rosária Geremia**, bibliotecária competente e extremamente atenciosa do Hospital São Lucas da PUCRS, por sua incansável e importante ajuda na execução deste estudo.

A minha prezada cunhada e amiga **Dra Thais Thomé Feldens**, pela ajuda importante e o tempo disponibilizado para a execução dessa tese.

Ao estimado **Dr. Abrão Slavutski** pelos bons conselhos e incentivo constante para a execução e concretização desse trabalho.

Ao prezado **Dr. Rafael Ott** pela disponibilidade e ajuda na coleta das células da medula óssea humana.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS, **Ana, Carlos, Davenir e Marcos** pela atenção e ajuda.

## SUMÁRIO

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>3. REVISTA DA LITERATURA</b>	<b>28</b>
3.1 Tecido Ósseo	29
3.2 Células Mesenquimais Indiferenciadas	31
3.3 Células Osteoprogenitoras	36
3.3.1 Osteoblastos	37
3.4 Osteoindução e osteocondução	41
3.5 Arcabouço	42
3.5.1 Osso alógeno	44
3.6 Marcadores ósseos	50
3.7 Fatores de crescimento	54
3.7.1 Meio de cultura para indução de células indiferenciadas em células osteogênicas	55
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>56</b>
4.1 Aspectos Bioéticos	57
4.2 Grupos experimentais	57
4.3 Obtenção de osso alógeno	59
4.4 Coleta de células tronco adultas da medula óssea humana	59
4.5 Dissociações da medula óssea para obtenção de células tronco adultas	61
4.6 Caracterizações das populações celulares	61
4.7 Cultura de células tronco mesenquimais associada a um arcabouço de osso alógeno	61
4.8 Indução das células tronco mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica associadas a osso alógeno	62
4.8.1 Cultura de células tronco mesenquimais sobre osso alógeno em meio osteogênico (DAG)	62
4.9 Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células mesenquimais indiferenciadas sobre um arcabouço de osso alógeno com e sem meio osteogênico	63
4.10 Extrações do RNA total das células em cultura	63
4.10.1 Extração do RNA total com Trizol	63
4.11 Transcrição Reversa para obtenção do cDNA	64
4.12 PCR em tempo real (qRT-PCR)	65
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>67</b>
5.1 Aspectos Morfológicos, Proliferativos e de Diferenciação das Células da Medula Óssea Humana associadas a um arcabouço de osso alógeno analisadas em MEV	68
5.2 A expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas da linhagem osteogênica, osteopontina (SPP1), osteocalcina (BGLAP) e fosfatase alcalina (ALP) utilizando a técnica da PCR em tempo real.	75
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>78</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>94</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

ALP	Fosfatase alcalina
$\beta$ -actina	Beta- actina
aFGF	Fator de crescimento de fibroblasto ácido
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGLAP	Osteocalcina
BMP	Proteína morfogenética óssea
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIOMS	Conselho para as Organizações Internacionais de Ciências Médicas/ <i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
CMI	Célula mesenquimal indiferenciada
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Ct	Ciclo limiar
°C	Graus centígrados
DAG	Meio osteogênico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxirribonuclease
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
dt	Dideoxitimidina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de etídio
FBS	Soro fetal bovino
g	Gramas(s)
g	Força gravitacional
h	Hora
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H <sub>2</sub> O	Água
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I

IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina-II
IgG	Imunoglobulina G
Kb	Quilobases
KDa	Quilo-dalton (unidade de massa atômica)
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSCs	Células tronco mesenquimais
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
NOS	Oxido nítrico sintase
OP-1	Proteína osteogênica-1
pb	Pares de base
p/v	Peso/volume
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PTH	Hormônio da paratireóide
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
QT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
rh	Recombinante humana
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
s	Segundos
SPP1	Osteopontina
TAE	Tris ácido acético EDTA
Taq	Enzima DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-β
TGF-β2	Fator de crescimento e transformação-β2
U	Unidade
USA/EUA	United States of América/Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
VK	Von Kossa
v/v	Volume/volume
μl	Microlitro
μM	Micromolar

®  
%

Marca registrada  
Por cento

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 - Placa representativa para análise em sete dias com moedas de osso alógeno (arcabouço) associadas a células da medula óssea sem meio e com meio osteogênico DAG..... 58**
- Figura 2 - Osso alógeno córtico-esponjoso fresco congelado em moedas..... 58**
- Figura 3 - Coleta de células tronco adultas da medula óssea humana oriunda da região do íliaco. ....60**
- Figura 4 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com sete dias de experimento sem meio osteogênico. ....69**
- Figura 5 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com sete dias de experimento com meio osteogênico. ....70**
- Figura 6 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com quatorze dias de experimento sem meio osteogênico. ....71**
- Figura 7 -. Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com quatorze dias de experimento com meio osteogênico. ....72**
- Figura 8 -. Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com vinte e um dias de experimento sem meio osteogênico. ....73**
- Figura 9 - Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com vinte e um dias de experimento com meio osteogênico. .... 74**

**Figura 10 - Representação da expressão dos genes das proteínas fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina sem meio e com meio osteogênico (DAG) em 7, 14 e 21 dias, quantificadas por PCR em tempo real. .... 75**

**Figura 11 - A expressão do gene SPP1 com meio osteogênico (SPP1c) e sem meio osteogênico (SPP1s) foi quantificada por PCR em tempo real em células tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas. .... 76**

**Figura 12 - A expressão do gene BGLAP com meio osteogênico (BGLAPc) e sem meio osteogênico (BGLAPs) foi quantificada por PCR em tempo real em células tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas.....76**

**Figura 13 - A expressão do gene ALP com meio osteogênico (ALPc) e sem meio osteogênico (ALPs) foi quantificada por PCR em tempo real em células tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas. .... 77**

**RESUMO**

## RESUMO

---

As células tronco mesenquimais originárias do estroma da medula óssea humana possuem grande capacidade de diferenciação em diversos tecidos, inclusive osso. Culturas de células tronco mesenquimais *in vitro* podem sofrer osteoindução e produzir células dos diferentes estágios da linhagem osteoblástica. A busca de um arcabouço adequado quanto a sua capacidade osteocondutora e osteoindutora vem sendo um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea. Neste estudo verificou-se o papel de um arcabouço alógeno fresco congelado e do meio de cultura (DAG) sobre a osteogênese de células tronco adultas. Os aspectos morfológicos das células osteogênicas e do arcabouço, além da expressão das proteínas osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina ósseas foram analisadas em sete, quatorze e vinte e um dias de cultura, sem e com meio osteogênico (DAG). Os resultados obtidos do sétimo dia até o vigésimo primeiro dia da pesquisa demonstraram a presença de aumento na adesão, migração, crescimento e diferenciação celular óssea. O meio DAG foi um acelerador da osteogênese, verificado principalmente, nas primeiras duas semanas. O arcabouço de osso alógeno, *in vitro*, apresentou a capacidade de suportar a osteogênese até a mineralização em todas as culturas. Assim, concluiu-se que as células derivadas da medula óssea humana podem: aderir, migrar, crescer, proliferar e se diferenciar sobre um arcabouço de osso alógeno fresco congelado. O meio osteogênico acelera a adesão, migração, crescimento, proliferação e diferenciação das células tronco adultas em osteoblastos principalmente nos primeiros quatorze dias de cultura. Os osteoblastos foram obtidos a partir de células de medula óssea humana sobre um arcabouço de osso alógeno fresco congelado, mesmo sem adição de fatores osteoindutores. Finalmente, o arcabouço de osso alógeno fresco congelado é osteocondutor e osteoindutor quando associado com células tronco adultas.

**Palavras-chave:** células de medula óssea humana; célula mesenquimal indiferenciada; células osteoprogenitoras, arcabouço; osso alógeno; osteoblastos; osteoindução e osteocondução.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

---

Mesenchymal stem cells (MSCs) originated from human bone marrow stromal cells have the capacity to differentiate into various tissues, including bone. MSCs cultures can differentiate *in vitro* into cells from different stages of the osteoblastic lineage. The search for a scaffold with appropriate osteoconductive and osteoinductive capacities has been one of the main challenges of bone tissue engineering. In this study, we evaluated the function of a fresh frozen allogenic scaffold and the culture medium (DAG) on the osteogenesis of adult stem cells. The morphology profile of osteogenic cells and scaffold, besides the expression of proteins osteopontina, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase were analyzed in seven, fourteen and twenty-one days of culture, with and without osteogenic medium (DAG). The results of the seventh day to the twenty-first day of the survey demonstrated an increase in the adhesion, migration, growth, and bone cell differentiation. The medium DAG enhanced osteogenesis, mainly in the first two weeks. The scaffold of allogenic bone showed the ability to support cell differentiation from osteogenesis up to mineralization of all cultures *in vitro*. Therefore, we concluded that cells derived from human bone marrow can: adhere, migrate, grow, proliferate, and differentiate when cultured over a fresh frozen allogenic bone scaffold. The osteogenic medium accelerates the adherence, migration, growth, proliferation and differentiation of adult stem cells in osteoblasts mainly on the first fourteen days. The osteoblasts were obtained from human bone marrow cells cultured over a scaffold of fresh frozen allogenic bone, even without the addition of osteoinductive factors, and this scaffold is osteoconductive and osteoinductive when associated with adult stem cells.

**Keywords:** human bone marrow cells, undifferentiated mesenchymal cells, osteoprogenitor cells, scaffold, allogenic bone, osteoblasts, bone and osteoconduction.

## **INTRODUÇÃO**

# 1 - INTRODUÇÃO

---

Com o emprego da alta tecnologia aplicada aos sistemas de implantes dentários osseointegrados e o aumento gradativo de sua indicação objetivando a reabilitação bucal no que tange à função e à estética, ficou implícita a necessidade de os cirurgiões-dentistas conhecerem, dominarem e alterarem, de forma positiva, a fisiologia do tecido ósseo visando à correção de defeitos ósseos maxilares, os quais, na grande maioria dos casos, inviabilizam, em um primeiro momento, a colocação dos implantes dentários nas condições necessárias e preconizadas para o sucesso do tratamento (1).

A avaliação de adequado volume ósseo para a colocação de implantes dentários é frequentemente diminuída por traumatismos dentários e alveolares, patologias, doenças periodontais e perdas dentárias precoces ou não. A reabsorção acentuada dos maxilares resulta em deformidades que inviabilizam a indicação de implantes dentários pela impossibilidade da obtenção de ancoragem, bom posicionamento e posterior restauração da estética (2; 3).

O reparo de defeitos ósseos nos maxilares causados por traumas, neoplasias e doenças neonatais ainda é um grande desafio para a cirurgia bucomaxilofacial. As reconstruções de partes perdidas na região são, geralmente, preenchidas com enxerto ósseo autógeno. Procurando evitar a morbidade causada por esse tipo de tratamento, tem-se pesquisado sobre substitutos do osso, bem como a respeito da produção de osso por meio da bioengenharia (4; 5).

Os enxertos autógenos ainda são considerados os melhores devido a sua capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora. No entanto, apresentam desvantagens no que se refere ao limite de quantidade de osso disponível e a morbidade causada na região doadora. Devido a essas limitações aumentou o nível de interesse em alternativas de enxertia óssea com enxerto alógeno e xenógeno (6).

Pesquisas com a finalidade de reconstruir defeitos ósseos na face estão voltadas para o aumento da regeneração óssea, tentando evitar a necessidade da utilização de enxertos ósseos autógenos. Uma das mais recentes inovações é a engenharia tecidual relacionada ao crescimento do osso, na qual são cultivadas células em meios adequados, criadas para a formação de tecido ósseo no local desejado (7).

A busca do desenvolvimento de técnicas minimamente invasivas para a correção facial de tecido mole e esquelético tem crescido muito atualmente. A possibilidade de mínima manipulação dos tecidos e maior rapidez nos procedimentos reconstrutivos diminui a dor e a morbidade nas áreas doadoras. A remoção de blocos ósseos intrabucais da sínfise e ramo mandibular, apesar de sua previsibilidade de sucesso em devolver contorno e volume ósseo adequados, apresentam riscos de causar complicações trans e pós-operatórias, como pouca área doadora (insuficiência de volume ósseo para corrigir os defeitos), parestesias, sensibilidade e perda de vitalidade dentária. Além disso, há a necessidade de cirurgia adicional e maior tempo cirúrgico assim como a dificuldade de aceitação do paciente em se submeter ao procedimento (3; 8; 9).

A classificação das células naturais utilizadas na engenharia óssea tecidual inicia pelas células totalmente indiferenciadas e ilimitadas que são as embriogênicas e as oriundas do cordão umbilical. Depois aparecem as células multipotentes que são as células progenitoras derivadas do tecido adiposo, medula óssea, periósteo, vasos sanguíneos e placenta. Por último surgem as células diferenciadas que são: os pré-osteoblastos, a linhagem celular intermediária entre pré-osteoblastos e osteoblastos, os osteoblastos e por fim os osteócitos (10;11).

As células progenitoras multipotentes são o maior reservatório de diferentes classes de células sendo as provenientes do tecido adiposo e da medula óssea (removidas por aspiração no ato cirúrgico), as mais utilizadas e com bons resultados (11).

Um grande número de estudos indica que células derivadas da medula óssea têm alto poder osteogênico. Ainda não está claro, entretanto, se múltiplas linhagens têm potencial osteogênico ou se uma única célula tronco dá origem a essas linhagens e a outros tipos celulares. A maioria das investigações, até o momento, indica que as células mesenquimais indiferenciadas (CMI) sofrem osteogênese, quando em cultura, na presença de citocinas ativadoras de osso (12).

Métodos de isolamento e expansão de células tronco mesenquimais em cultura têm sido desenvolvidos. As culturas, *ex vivo*, mantêm seu fenótipo multipotente além de serem capazes de se diferenciarem em várias linhagens. Células tronco mesenquimais humanas, *in vitro*, expressam e secretam citocinas osteogênicas enquanto retêm seu fenótipo diplóide (13).

Como alternativa para substituir os enxertos intrabucais, têm sido utilizado materiais ósseos substitutos como enxerto alógeno e ou xenógeno e materiais aloplásticos. Recentes avanços nas pesquisas com osso alógeno demonstram a preservação de uma larga porção de componentes minerais do enxerto removido da região da crista ilíaca (3).

A engenharia tecidual óssea é a construção, reparo ou reposição de defeitos ou perdas ósseas em humanos ou animais. Ela pode ser realizada dentro do corpo de animais ou de maneira extracorporal, para depois ser enxertada em um corpo. Tipos celulares específicos e um arcabouço são o mínimo necessário para requerermos pesquisas dentro da engenharia tecidual (14).

Da engenharia tecidual vem emergindo a possibilidade de alternativas estratégicas para a regeneração óssea. Três componentes têm sido postulados como essenciais: isolamento e expansão de osteoprogenitores ou células-tronco, presença de fatores osteoindutores apropriados e um meio que mimetize um ambiente propício para a regeneração óssea (15).

Com o advento da Biologia Molecular, e em particular, da tecnologia do DNA recombinante, aumentou substancialmente o entendimento sobre moléculas que

induzem a formação e o crescimento ósseos. Esse método tem permitido a produção de grande quantidade dessas proteínas. Múltiplas BMPs têm sido clonadas e expressas, tendo sua ação celular e atividade osteogênica caracterizadas *in vitro* e *in vivo* (16).

A presença de indutores osteogênicos como BMPs, ácido ascórbico, dexametasona e  $\beta$ -glicerolfosfato determinam que células mesenquimais indiferenciadas transformem-se em osteoblastos e a partir de então expressem fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e outras proteínas ósseas além de uma matriz extracelular (5; 9; 17; 19; 20).

Anticorpos monoclonais têm sido utilizados para caracterizar a linhagem osteogênica *in vitro* desde os primeiros estágios de sua diferenciação. Proteínas ósseas, como a osteonectina, a osteopontina e a osteocalcina, são marcadores ósseos que, associados ou não, ajudam a identificar e a esclarecer as distintas etapas da diferenciação osteogênica durante o processo osteoindutivo (21).

É certo que uma vez esclarecidos os mecanismos que envolvem à diferenciação de células tronco em osteoblastos, e dos materiais mais apropriados para promover a osteocondução, osteoindução e osteogênese, os procedimentos cirúrgicos que exigem uma resposta tecidual óssea satisfatória (como, por exemplo, casos de implantes dentários osseointegrados e enxertos ósseos) seriam favorecidos pela viabilização e pela redução do tempo de cicatrização, pela menor morbidade operatória e possibilidade de planejamento, assim como tratamento qualificado. Assim, o osso alógeno fresco congelado, por sua viabilidade clínica e sua crescente utilização em procedimentos cirúrgicos para a correção de defeitos ósseos, nessa pesquisa *in vitro* transforma-se em um arcabouço associado a células tronco adultas e a presença ou não de um meio osteogênico durante vinte e um dias de experimento.

## **OBJETIVOS**

## **2 - OBJETIVOS**

2.1 Avaliar a capacidade do meio osteogênico (DAG) em promover proliferação e diferenciação de células tronco adultas da medula óssea em células da linhagem osteogênica cultivadas sobre um arcabouço de osso alógeno.

2.2 Avaliar a capacidade do arcabouço de osso alógeno em promover a adesão, proliferação e diferenciação de células tronco adultas da medula óssea em células da linhagem osteogênica.



## 3 - REVISTA DA LITERATURA

---

### 3.1 Tecido ósseo

O osso difere dos demais tecidos não somente por sua estrutura fisiomecânica, mas, também, por sua extraordinária capacidade de crescer e manter contínuos remodelamento e regeneração (22).

O metabolismo ósseo é mantido por um contínuo processo de reabsorção e neoformação ósseas. Dois mecanismos têm sido postulados para o controle desse processo: regulação sistêmica, por meio de hormônios reguladores da taxa de cálcio e fosfato, e regulação local, na qual ocorre a participação de fatores de crescimento que atuam sobre células mesenquimais indiferenciadas, resultando em neoformação óssea (23).

O osso é um tecido complexo que está constantemente passando por um processo morfológico dinâmico, seguindo sua formação inicial, seu crescimento, seu reparo e sua remodelação, em resposta a mudanças físicas e biomecânicas sofridas pelo corpo humano (24).

Durante a totalidade de sua vida, o esqueleto é sujeito a constante remodelação, objetivando manter o tecido ósseo com suas propriedades biomecânicas inalteradas. O remodelamento e a cicatrização de fraturas ósseas são exemplos da capacidade regenerativa do tecido ósseo graças à atuação das células mesenquimais indiferenciadas e de sua ação progenitora (células osteoprogenitoras) (25).

O osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma dinâmica integração biológica de processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação ósseas. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual

óssea que vão determinar a capacidade de osteoindução: sinais osteoindutores solúveis, viabilidade das células mesenquimais indiferenciadas em responder e ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, além de uma adequada matriz extracelular (26).

O osso contém uma variedade de diferentes tipos celulares: células vasculares, medula óssea, pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos, condroblastos e osteoclastos, todos executando distintas funções celulares com alta dinâmica dentro da engenharia óssea *in vitro* (18).

### **3.2 Células mesenquimais indiferenciadas (CMI)**

As pesquisas com células-tronco estão aprimorando o conhecimento sobre o crescimento e o desenvolvimento de um organismo a partir de uma única célula (blástula). Devido às dificuldades práticas de obtenção de células-tronco embrionárias decorrentes de aspectos éticos, morais e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas, principalmente aquelas derivadas do estroma da medula óssea e de tecido adiposo, sendo que, em ambos os casos, estas células apresentam um excelente potencial terapêutico (20).

As células mesenquimais indiferenciadas são células progenitoras pluripotentes, que se dividem muitas vezes e em diversos caminhos, formando tecidos esqueléticos, como, por exemplo, cartilagem, osso, tendão, ligamentos e tecido conjuntivo. Essas células não são governadas por si só ou limitadas a um número fixo de divisões mitóticas; a sua progênie é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos que, combinados, são responsáveis pelo controle da expressão dos padrões molecular e celular, resultando em tecidos específicos, com funções também específicas, com base no seu repertório molecular. Ademais, durante a progressão da célula mesenquimal indiferenciada até a finalização de seu fenótipo, ela sofre a influência da regulação parácrina e da regulação autócrina, quando a soma de todos esses sinais intrínsecos e extrínsecos define o desenvolvimento e o fenótipo celulares (27).

O mesoderma origina todos os elementos do esqueleto. A habilidade que as células mesenquimais possuem de se espalhar e migrar desde as primeiras fases do desenvolvimento embriológico, entre as camadas ectodérmicas e endodérmicas, é o elemento-chave para todo reparo tecidual em organismos adultos relacionados à derme, aos ossos e aos músculos (27).

O osso adulto pode conter fatores que estimulam o reparo ósseo, recapitulando o desenvolvimento embriológico e a morfogênese (28).

Existem vários tipos de células naturais inalteradas geneticamente que podem ser usadas na engenharia óssea, que vão desde de células completamente indiferenciadas como as células tronco embriogênicas ou do cordão umbilical até as já totalmente diferenciadas como os osteoblastos (11).

São conhecidos três tipos principais de células tronco, classificadas de acordo com o tecido de origem: as células tronco embrionárias, derivadas da camada interna de células do blastocisto, as células tronco presentes no sangue de cordão umbilical e as células-tronco adultas, tipo de célula tronco obtida de tecido após a fase embrionária (feto, recém-nascido e adulto). Sendo assim, as células tronco adultas são encontradas em áreas como o tecido adiposo, o neuronal, o muscular e na medula óssea (20).

Células indiferenciadas pluripotentes têm sido cultivadas em tecido fetal humano e demonstram habilidade em aumentar a variedade de tipos celulares diferenciados nas camadas germinativas do embrião. A partir disso, muitos tecidos adultos contêm populações de CMIs capazes de promover a renovação tecidual após trauma, doença e/ou idade. No estudo *in vitro* sobre CMIs adultas retiradas da medula óssea da crista de íliaco de doadores humanos, entre 19 e 57 anos de idade, caracterizou-se a diferenciação osteogênica, salientando que a medula óssea adulta pode conter diversas linhagens de CMIs que contribuirão para a regeneração de tecidos mesenquimais como osso, cartilagem, músculo, ligamento, tendão, gordura e tecido conjuntivo. Esse processo de diferenciação é influenciado, significativamente,

por nutrientes basais, densidade celular, organização espacial, forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas (29).

O estroma da medula óssea consiste de uma população heterogênea de células que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Adicionalmente, esse estroma contém células com características de células-tronco, as quais se diferenciam em osso, cartilagem, adipócitos, além de se constituírem um suporte hematopoiético para os tecidos (30).

As células do estroma da medula óssea são comprometidas com a regeneração, recriando um meio embrionário em tecidos adultos lesados. Estas células têm propensão a se aderir em cultura permitindo se isolarem de outras células medulares, sendo possível, verificar sua proliferação e diferenciação em osteoblastos, condroblastos, mioblastos e adipócitos (31).

Células hematopoiéticas estão amplamente associadas com células do estroma da medula óssea, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, quando essas células do estroma estão em cultura, as hematopoiéticas bem diferenciadas são normalmente removidas por técnicas de lavagens seletivas e aderência (31; 32).

Osteoblastos, condrócitos, miócitos e adipócitos derivam de células progenitoras comprometidas, sendo oriundas das células mesenquimais indiferenciadas. Essas células estão presentes em diversos locais, como os tecidos ósseo, muscular, subcutâneo e adiposo (33).

Pesquisa sobre reservas humanas de células mesenquimais indiferenciadas pluripotentes em tecidos conjuntivos do músculo esquelético e da derme fornecidas por doadores fetais, adultos e geriátricos, demonstrou que todas as populações continham linhagens de células tronco progenitoras comprometidas com a miogênese, adipogênese, condrogenese e osteogênese, assim como linhagens de células tronco pluripotentes descomprometidas, são capazes de formar células musculares, adipócitos, cartilagem, fibroblastos, osso e células endoteliais. Além desses achados as células tronco residentes em um tecido podem diferenciar em

tipos celulares de outros tecidos, citando como exemplo, as da medula óssea que se diferenciam em neurônios e glia, células tronco do tecido neural em tecido sangüíneo e reservas de célula tronco da derme que podem se transformar em músculo esquelético, gordura, cartilagem e osso (34).

Células tronco mesenquimais também chamadas de células tronco adultas, tem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos de linhagens celulares durante a vida, mesmo após doenças, traumas e o avanço da idade. Essas células podem ser encontradas ou obtidas de vários tecidos como medula óssea, tecido adiposo, parede dos vasos, sangue periférico, placenta no estágio fetal e materno, ligamento periodontal, periósteo e osso trabeculado (11).

Buscando utilizar as células mesenquimais indiferenciadas como uma forma de terapia gênica visando o tratamento de lesões ósseas em trabalho *in vitro*, células derivadas da medula óssea com o vetor de adenovírus recombinante contendo a BMP-2 humana foram transfectadas. Com as células transfectadas em cultura, observa-se a proliferação e a diferenciação osteogênica das CMIs, enquanto que, *in vivo*, tais células, depois de transplantadas no rádio de ratos, são capazes de formar osso e cartilagem, além de regenerar defeitos ósseos (35).

A medula óssea contém células com um grande potencial osteogênico, incluindo células precursoras osteogênicas totalmente comprometidas com a osteogênese (12; 36; 37).

A potencialidade osteoblástica das células do estroma da medula óssea demonstrou que as mesmas, além de uma fonte de fatores de crescimento, possuem como parte de seu sistema de células estromais, células tronco mesenquimais. Sua progênie é capaz de se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo os precursores osteogênicos (37).

Estudo *in vitro* das características das CMIs encontradas no trabeculado ósseo humano obtido a partir de fêmur de pacientes com idade entre 55 e 80 anos, concluiu que a cultura dessas células, quando comparadas às células do estroma da

medula óssea, apresenta total semelhança, em relação ao tempo e ao padrão de diferenciação osteogênica (38).

As células mesenquimais indiferenciadas estão presentes, em pequeno número, em todos os tecidos normais, permanecendo em repouso até que, a partir de um sinal ou evento, iniciam a sua dupla capacidade: de divisão celular e de auto-renovação. O resultado dessa divisão celular leva a duas células-filhas distintas, tendo uma delas a função de se proliferar produzindo progenitoras que, subseqüentemente, diferenciam-se para formar um tecido maduro. A outra célula filha retorna ao seu estágio original de repouso até que um novo sinal ocorra. Tal característica mantém o fenótipo da célula mesenquimal indiferenciada, preservando toda a capacidade original da célula-mãe (39).

Do período embrionário até o adulto, as células-tronco, em cada órgão em desenvolvimento, vão se tornando progressivamente restritas em sua capacidade de diferenciação, ficando cada vez mais comprometidas com uma determinada função. Inicialmente, as populações de células-tronco confinadas a um seletivo grupo de tecidos (endoderma, ectoderma ou mesoderma) são multipotentes, porém, com o processo de desenvolvimento, algumas delas podem permanecer pluripotentes, capazes de se diferenciar em uma ou mais linhagens. Outras células tornam-se progressivamente limitadas, com a capacidade de gerar somente um tipo celular. Essa restrição parece ser o resultado de mudanças adaptativas críticas e irreversíveis no núcleo celular (39).

A capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação de células derivadas de tecidos adultos diminuem com a idade, o que valoriza significativamente a utilização de células embriogênicas por sua potencialidade e alta capacidade em fornecer células osteoprogenitoras e osteoblastos de forma ilimitada (11).

O ciclo de vida de uma célula mesenquimal indiferenciada é um processo regulado por cinco atividades fundamentais: ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência (ou morte) (39).

A medula óssea possui precursores osteogênicos e, portanto, apresenta alto potencial de regeneração óssea. Os autores ainda salientam que essas células osteoprogenitoras podem ser isoladas e estudadas pelo uso seletivo de marcadores (14).

O isolamento das células mesenquimais indiferenciadas é geralmente baseada no gradiente de densidade na centrifugação e nas técnicas de cultura celular. Além disso, o fenótipo das células permanece estável durante a cultura e não existe perda do potencial osteogênico, condrogênico e adipogênico (18).

### **3.3 Células osteoprogenitoras**

A maioria das osteoprogenitoras presentes nas células da calvária de fetos de ratos e derivadas do estroma da medula óssea de ratos adulto jovens em cultura tem capacidade de renovação e tempo de vida limitado. Evidências sugerem que existem, no mínimo, dois tipos distintos de populações de osteoprogenitores. Uma população com capacidade de promover diferenciação *in vitro* e outra, aparentemente menos diferenciada, que sofre diferenciação osteoblástica somente após estímulos indutores específicos como dexametasona, outros esteróides e fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas. Tais substâncias aumentam o número de nódulos ou colônias ósseas nas culturas de estroma da medula óssea e da calvária de ratos (32; 40).

A maioria das pesquisas aponta que as CMIs, quando em cultura e na presença de citocinas ativadoras do osso, sofrem osteopoiose, processo esse que envolve a proliferação e a maturação de células precursoras primitivas até a formação de osteoblastos funcionais, sendo que as células ósseas originadas das CMIs comprometidas com a osteogênese são as células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. O autor acredita que, pelo fato de essas células apresentarem um desenvolvimento contínuo ilimitado, não há, conseqüentemente, diferença de comportamento entre elas (12).

O caminho da diferenciação osteoblástica é modulado por interações entre células progenitoras (osteoprogenitoras) e suas vizinhas, a matriz envolvida e uma ampla extensão de fatores solúveis, incluindo o de crescimento e transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), o semelhante à insulina II (IGF-II), várias interleucinas, ácido retinóico, glucocorticóides, estrógeno, hormônios da paratireóide, vitamina D e tiroxina. Vários membros da família das BMPs são altamente efetivos nessa diferenciação (39).

A engenharia óssea tecidual requer a atividade de células osteoprogenitoras e osteoblásticas, sendo possível mantê-las por longo período de tempo. (18).

As células osteogênicas quando mantidas em condições ideais de cultura certamente formarão nódulos ósseos em cultura (18).

### **3.3.1 Osteoblastos**

Os pré-osteoblastos representam um estágio de transição entre uma alta proliferação de células osteoprogenitoras e osteoblastos maduros, apresentando baixos níveis de proteínas ósseas, como a fosfatase alcalina, a osteonectina e a osteopontina, entre outras. Os pré-osteoblastos são predominantemente definidos, morfologicamente baseados em sua localização adjacente à atividade dos osteoblastos. Além do mais, essas células fornecem importantes informações à resposta de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização (12).

Os pré-osteoblastos são considerados precursores dos osteoblastos e de suas linhagens. Estas células compartilham do mesmo fenótipo dos osteoblastos, porém não expressam todos os marcadores dos osteoblastos maduros (11).

A grande capacidade de regeneração do osso é devido à presença de diferentes osteoblastos e que pelo fato das linhagens osteoblásticas, diferentemente das células tronco, não causarem problemas de ordem legal e de imunorejeição,

pode-se afirmar que os osteoblastos são o mais importante grupo celular na engenharia óssea tecidual (11).

Células osteoblásticas apresentam uma grande diversidade de morfologias e atividades (41), pois vão desde pré-osteoblastos com sua forma poligonal, osteoblastos cuboidais, osteoblastos sintetizadores de matriz e osteócitos de matriz embebidos na porção mineral até células que recobrem o osso, achatadas e finas. Esses inúmeros morfotipos são geralmente considerados diferentes estágios de maturação de uma única linhagem celular originada da proliferação e da diferenciação de células osteoprogenitoras. Análises cinéticas das colônias em crescimento mostram que os osteoprogenitores sofrem de nove a 10 alterações de população antes de surgir o primeiro osteoblasto morfologicamente diferenciado na colônia em desenvolvimento (42).

Embora muito tenha sido aprendido sobre o potencial de diferenciação das células progenitoras do estroma, relativamente pouco se sabe a respeito dos fatores que controlam esse sistema, como os estágios reguladores podem ser implementados e qual a relação hierárquica entre as células osteogênicas e suas linhagens. Tais informações são importantes para a linhagem osteogênica, já que as aberrações no suprimento de osteoblastos, a partir de suas células precursoras, provavelmente estão relacionadas a fatores vinculados à idade e às doenças ósseas (43).

O efeito da idade sobre a formação óssea ectópica induzida por BMP em ratos com um mês, 10 meses e 18 meses de vida, mostrou que a velocidade e a quantidade dessa formação de osso são reduzidas significativamente pelo avanço etário. A redução no anabolismo pode ser atribuída às mudanças nos níveis de hormônios e dos fatores de crescimento. Dois mecanismos têm sido postulados como principais causadores da diminuição da formação óssea ectópica: a idade, que pode reduzir a migração de células mesenquimais ao local do implante e, por conseguinte, diminuir o número de precursores osteogênicos, assim como a inabilidade de células osteogênicas para responder as BMPs (44).

Os osteoblastos são células especializadas que atuam diretamente sobre a formação óssea nos vertebrados. O tecido ósseo consiste, principalmente, de cristais de hidroxiapatita e vários tipos de proteínas na matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea e proteoglicanos. Tanto esses cristais de hidroxiapatita quanto as proteínas são regulados pelos osteoblastos e, além disso, a alta atividade enzimática da fosfatase alcalina e a resposta a hormônios e a citocinas são características importantes dos osteoblastos (45).

A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas elas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos (46).

Durante a embriogênese, o tecido ósseo é formado por dois caminhos distintos: ossificação intramembranosa e endocondral. Independentemente disso, os osteoblastos desempenham um único papel na formação de osso (28).

Na ossificação intramembranosa os osteoblastos são diferenciados diretamente das células mesenquimais, enquanto que na ossificação endocondral as células mesenquimais diferenciam-se, primeiro, em condrócitos, formando um molde de cartilagem. Assim, os osteoblastos são diferenciados a partir de células mesenquimais envolvidas imediatamente após a maturação hipertrófica dos condrócitos. Todo o processo de desenvolvimento ósseo e cartilaginoso sugere que tanto osteoblastos quanto condroblastos derivam de um progenitor celular comum (45; 47).

A formação óssea pela via intramembranosa está relacionada aos ossos da região craniofacial, enquanto que a ossificação endocondral pode ser caracterizada, na maioria das vezes, por ossos longos (28).

Quando uma BMP é implantada em um tecido subcutâneo de ratos, as células mesenquimais indiferenciadas são estimuladas a criar um processo similar à ossificação endocondral. No entanto, têm aumentado as evidências de que as BMPs podem induzir formação óssea diretamente, sem a seqüência endocondral. As pesquisas demonstraram que, em todos os grupos de ratos nos quais a BMP foi implantada, ocorreu ossificação intramembranosa (44).

Significativa resposta osteogênica com alta atividade de fosfatase alcalina, deposição de cálcio e formação de nódulos ósseos em pesquisa *in vitro* realizada avaliando o processo de diferenciação osteoblástica pela digestão enzimática e fracionada de calvária de feto de rato, forneceu uma população de células ricas em osteoprogenitores. Os osteoblastos são células primárias responsáveis pela formação óssea originados de células mesenquimais osteoprogenitoras localizadas dentro do tecido esquelético (48).

Quando mantidas sob condições de cultura adequadas, as células do estroma da medula óssea de camundongos formam nódulos ósseos, os quais representam o produto final da proliferação e da diferenciação das células osteoprogenitoras, relativamente raras, presentes no início da população celular. O processo de formação desses nódulos ósseos é dividido em três estágios de desenvolvimento: a proliferação, o desenvolvimento da matriz extracelular e a maturação e mineralização. O processo caracteriza-se por diferentes genes associados à proliferação, à atividade do ciclo celular, bem como à atividade e à heterogeneidade dos osteoblastos (49).

O processo de mineralização osteóide verificada em condições ideais de cultura de células osteogênicas, aparece em forma de estruturas em multicamadas que formam nódulos depois de um tempo (14).

### 3.4 Osteoindução e osteocondução

A osteoindução é o processo que sustenta a mitogênese de células mesenquimais indiferenciadas induzindo à formação de células osteoprogenitoras com capacidade de formar novo osso. Diferentemente de materiais osteocondutores, substâncias osteoindutoras provocam a formação óssea em locais extra-esqueletais (50).

A indução óssea é caracterizada por uma seqüência de múltiplos passos, em que as fases dessa cascata são a quimiotaxia, a mitose e a diferenciação em cartilagem e/ou osso. Verificou-se o desenvolvimento ósseo endocondral, a influência das BMPs na indução óssea *in vivo* e *in vitro*. A quimiotaxia e a migração das células mesenquimais ocorrem no primeiro dia; a proliferação (mitose), até o terceiro dia; a diferenciação em condroblastos, no quinto dia; a cartilagem hialina, no sétimo dia; a calcificação da matriz hipertrófica da cartilagem, no nono dia; a invasão vascular e angiogênese, no décimo dia; a formação óssea no décimo e décimo primeiro dias; a remodelação do osso, no décimo segundo ao décimo oitavo dia e a diferenciação *in situ* da medula hematopoiética, do décimo oitavo ao vigésimo primeiro dia (28).

A osteoindução caracteriza-se pela habilidade que algumas moléculas possuem de promover a formação óssea (51).

A osteoindução não depende apenas das células do hospedeiro, mas, também, da presença de células mesenquimais indiferenciadas. A potencialidade da osteoindução vai depender da habilidade que certa molécula e um determinado local têm para induzir células mesenquimais indiferenciadas a formar osso. A formação óssea é influenciada por muitos fatores, sendo o suprimento sanguíneo o mais importante, pois aumenta a oxigenação tecidual e, conseqüentemente, a formação de colágeno, a proliferação de fibroblastos e capilares, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, além da formação e da mineralização do calo ósseo (33).

### 3.5 Arcabouço

Trabalho visando à reconstrução de côndilos mandibulares de porcos *in vitro*, desenvolveu um arcabouço com um tipo de polímero biodegradável com o formato e as dimensões de um côndilo de porco e associou células autógenas manipuladas também *in vitro*. Conseguiu observar na superfície do arcabouço, osteoblastos com função e contínua proliferação. Outras pesquisas com arcabouços tridimensionais produzidos com células alógenas e xenógenas têm demonstrado que osteoblastos podem formar um tecido mineralizado usando técnicas de cultura *in vitro* (9).

Dentro da engenharia óssea os arcabouços devem apresentar uma estrutura arquitetônica que permita uma grande penetração celular ao longo de todo o corpo da peça, que permitam uma formação óssea uniforme e que apresentem uma boa perfusão para a penetração de oxigênio e do meio de cultura associado. Além disso, um dos grandes desafios é criar estruturas que tenham seu próprio suprimento sanguíneo. Para isso, pesquisadores sugerem que existam duas maneiras de solucionar esse grande problema: criar um arcabouço não vascularizado e após, *in vivo*, promover uma invasão de vasos sanguíneos na área ou, como melhor opção, criar a partir da tecnologia de microfabricação dentro da bioengenharia, um composto de osso e vasos sanguíneos (9).

A vascularização é também um promotor de osteogênese. Há a necessidade de mais investigações sobre a busca de uma rápida invasão de vasos sobre o arcabouço e células transplantadas. Além disso, a procura pela maximização da viabilidade e densidade celular, desenho e composições químicas ideais de arcabouços, tamanho dos seus poros e por fim características de sua superfície para permitir a manutenção celular e o seu potencial osteogênico são fundamentais (8).

Existem três fatores principais dentro da engenharia de tecidos que podem promover rápida regeneração óssea e integração com o tecido hospedeiro: condução (biomateriais), indução por fatores bioativos e transplante celular, onde ambos podem atuar individualmente ou em conjunto. A construção da engenharia óssea deve fornecer osteocondutividade auxiliando na formação e deposição de

osteoblastos e subsequente mineralização da interface do biomaterial e ou fornecer sinais osteoindutivos como as BMPs, hormônios e vitaminas para a formação óssea. Esses fatores também estarão diretamente interligados com o tamanho do defeito, o suprimento de células adjacentes a essa área, a velocidade de migração celular e a viabilidade de vascularização (8).

A engenharia óssea tecidual extracorpórea requer a interação de três componentes biológicos: células ósseas, fatores de crescimento e um arcabouço extracelular. Além disso, na formação de um tecido tridimensional *in vitro* utilizam-se células autógenas ou células doadoras dentro de um arcabouço (18).

Dentro da engenharia de tecido ósseo são necessárias células osteoprogenitoras ou osteoblásticas em combinação com um adequado arcabouço (17).

O desenvolvimento de enxertos ósseos, *in vitro*, através da engenharia tecidual, está diretamente relacionado a mudanças e tecnologias associadas a arcabouços. Vários tipos de matrizes estão sendo testadas dentro da engenharia de tecidos. Um arcabouço deve ser não tóxico, biocompatível, biodegradável e ter uma estrutura individual geométrica. Além disso, um arcabouço deve ser facilmente integrado com o tecido adjacente e favorecer novo crescimento ósseo (17; 19).

Em pesquisa com bioengenharia óssea e arcabouços, verifica-se a necessidade e a dificuldade de obtenção de arcabouços com arquitetura que seja favorável para a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras e manutenção de osteoblastos maduros (52).

As propriedades biológicas, físicas e químicas do arcabouço e de sua superfície são fundamentais para o direcionamento da resposta celular. As qualidades de um material em promover e possibilitar o recobrimento de osteoblastos sobre a superfície de um arcabouço será determinante para uma resposta tecidual adequada e, por conseguinte, determinar formação óssea. Essa fase de adesão de células osteoblásticas à superfície do arcabouço ocorre por um longo período e

envolve várias moléculas (proteínas da matriz extracelular, proteínas da membrana celular e proteínas do citoesqueleto) as quais interagem juntas para induzir subsequente resposta celular em termos de migração e diferenciação sendo a mineralização o último estágio desse processo sobre a superfície de um material (19).

Um bom arcabouço produzido pela bioengenharia deve possuir principalmente a morfologia semelhante a do osso perdido. Além disso, deve ter uma arquitetura interna que permita bom deslocamento celular (perfusão), boa orientação e espaço adequado (tamanho dos poros) para os osteoblastos e outras células, assim como, ter suas proteínas secretadas durante o processo de maturação osteoblástica. Somando-se a isso, um arcabouço ideal para osso deve ser biodegradável, não-tóxico, suportar as células aderidas, não ser remodelada por células locais e não alterar os níveis adequados de pH. Esse material deve ser altamente hidratado para manter o ambiente isosmótico, permitir a mobilidade e o crescimento de elementos angiogênicos, terem baixos níveis de imunogenicidade e ter a capacidade de ser fixado cirurgicamente com parafusos ou fio (17).

### **3.5.1 Osso alógeno**

A engenharia genética associada a células alógenas poderá ter um papel importante na engenharia de tecidos em humanos no futuro (18).

Enxertos homólogos também são conhecidos como alógenos ou alográficos sendo removidos de outros indivíduos dentro da mesma espécie (53).

Assim como as células autógenas, as células alógenas também podem ser consideradas como um dos principais e mais importantes armazéns de células para a engenharia de tecidos (18).

A falta de adequada quantidade de ossos para preencher grandes defeitos vem aumentando as aplicações clínicas da utilização de homoenxertos frescos e

congelados, para os quais ainda não existe substituto sintético satisfatório e em quantidade suficiente (54).

O uso de osso alógeno na engenharia de tecidos é ideal, pois diferentemente de outros arcabouços, apresenta propriedades estruturais e mecânicas semelhantes a tecido ósseo vivo, não apresenta morbidade e frequentemente, é utilizado na prática clínica para correção de defeitos ósseos (55).

As vantagens do osso autógeno em relação ao osso alógeno estão principalmente relacionadas ao fornecimento de células osteogênicas já na primeira fase da formação óssea e também por não causarem nenhum tipo de resposta imunológica. Como desvantagens do osso autógeno esta a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para a remoção do osso doador, a maior morbidade e muitas vezes uma inadequada quantidade de osso disponível para doação (53).

Os tratamentos utilizados para eliminar a resposta imunológica destroem células ósseas remanescentes dentro do enxerto, além disso, o enxerto homólogo não participa da primeira fase da osteogênese (não apresenta células viáveis para a primeira fase da osteogênese) sendo sua contribuição puramente passiva nesse processo, atuando assim, na segunda fase da osteogênese e na osteoindução como uma matriz de tecido duro (53).

O enxerto alógeno ideal seria aquele que promovesse nova formação óssea a partir da osteoindução e que fornecesse um arcabouço para suportar a regeneração do osso hospedeiro que eventualmente ainda não aconteceu sobre esse arcabouço. O potencial de osteoindução e osteocondução do enxerto alógeno depende da sua técnica de processamento, ou seja, se é desmineralizado, congelado-seco (liofilizado) ou fresco congelado (2).

Algum potencial osteoindutivo pode ficar retido no osso alógeno mesmo após o seu processamento. Essa capacidade osteoindutora esta atribuída predominantemente à permanência de proteínas morfogenéticas ósseas e também fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento derivado das

plaquetas e fator de crescimento semelhante à insulina na matriz colágena. Estas proteínas podem ter um papel importante na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em linhagem osteogênica quando em cultura *in vitro* (55).

Apesar da inferioridade do enxerto homólogo em relação ao auto-enxerto no que se refere ao potencial osteogênico, existe uma boa incorporação do transplante ósseo homólogo em áreas receptoras (56).

Trabalho com três pacientes que foram submetidos a enxerto alógeno de crista ilíaca na região de maxila anterior e mandíbula posterior e colocação de implantes dentários nessas áreas apresentou regeneração óssea funcional, e em locais biopsiados sobre essas regiões, houve nova deposição óssea (3).

Ainda como vantagem está à facilidade em escolher o tipo e o volume de osso que se quer, além da possibilidade de moldar esse bloco ósseo de acordo com a anatomia e necessidade do local com o defeito ósseo (53).

Dentre algumas das maiores vantagens do uso dos homoenxertos esta a redução do tempo de cirurgia e anestesia, redução da perda sanguínea, redução das potenciais complicações relativas ao local de doação de auto-enxertos como infecções, hematomas, lesões vasculares e nervosas, instabilidade da articulação sacro-ilíaca, deformidades cosméticas e a dor crônica atribuída aos locais de doação (54; 56; 57).

Pesquisa avaliou em um período de três anos e meio a realização de enxertos homólogos em 135 pacientes que sofreram traumas ou tumores faciais além de pacientes que apresentavam deformidades faciais. Complicações pós-cirúrgicas ocorreram em apenas cinco pacientes, estando essas intercorrências relacionadas à exposição e ou seqüestro ósseo e desenvolvimento de união fibrosa entre a porção receptora e doadora. Em nenhum caso houve a transmissão de doenças (53).

Embora o medo de infecção com HIV e Hepatite seja grande e tenha recebido uma significativa atenção, o pequeno número de casos documentados com

contaminação, indicam que a incidência é rara em transplantes ósseos. Com adequadas precauções e excelentes testes laboratoriais a incidência transmissão de HIV é de uma em um milhão. Segundo dados da *American Association of Tissue Bank* a probabilidade de obtenção de um enxerto ósseo contaminado com o vírus HIV nos Estados Unidos é de uma em oito milhões, porém no Brasil ainda não há dado estatístico. O próprio processamento do osso homólogo onde se utilizam álcool e outras substâncias químicas além de radiação gama e ultravioleta, inativa o vírus do HIV (53; 56).

Os enxertos alógenos estão sendo muito utilizados, porém apresentam algumas limitações como à necessidade de descoberta de compatibilidade sanguínea, transmissão de patógenos como HIV, hepatite B e Hepatite C e ainda a necessidade de drogas imunossupressoras devido ao risco da imunorrejeição. No entanto, devido aos recentes avanços biotecnológicos, a engenharia óssea tecidual tem conseguido viabilizar clinicamente alternativas para a sua utilização (5).

A observação rigorosa dos critérios de exclusão e realização de testes bacteriológicos e sorológicos reduz significativamente os riscos de contaminação infecto-contagiosa por parte do receptor (56).

Atualmente os exames de detecção de doenças são muito precisos e os protocolos de seleção de doadores são muito rígidos, tornando insignificante a possibilidade de transmissão de doenças (58).

O advento dos bancos de tecidos, ampliação e melhora das técnicas de preservação, o risco de transmissão de doenças e o potencial de antigenicidade podem ser controlados por meio dos métodos de congelamento e processamento. O congelamento dos aloenxertos frescos diminui de forma considerável a resposta imune do hospedeiro preservando as propriedades biomecânicas e osteoindutoras do enxerto. A associação de congelamento e desidratação, como na liofilização, diminui ainda mais a resposta imune, no entanto, determinam alterações biomecânicas indesejáveis, ressaltam os pesquisadores (57).

Os enxertos homólogos são utilizados desde o século 19, porém a partir de recentes avanços nas técnicas de coleta, armazenamento, preservação e transplantação desses enxertos é que houve um aumento considerável na sua utilização em ortopedia (59).

Estudos sobre transplantes ósseos iniciaram no século 19 com Ollier em 1867 ao entender as propriedades osteogênicas do tecido ósseo e do periósteo. Após Albee em 1912 iniciou o armazenamento de enxertos ósseos em locais resfriados e em 1942 e 1947 Inclan e Wilson relataram, respectivamente, o uso de osso preservado, em cirurgias ortopédicas. Já em 1985, Friedland verificou a influência benéfica do frio na preservação das qualidades osteogênicas do enxerto (56; 58).

O desempenho superior dos enxertos autógenos se deve as suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras enquanto o osso alógeno fresco congelado não tem qualidades osteogênicas embora possa ainda assim promover osteoindução e osteocondução já que o congelamento diferentemente da liofilização e da esterilização, preserva essas propriedades (58).

Os aloenxertos ósseos são usados não só por suas propriedades osteoindutoras, mas principalmente pelas osteocondutoras (57).

Os homoenxertos congelados funcionam como molde para a néoformação óssea, agindo principalmente como osteocondutores e menos como osteoindutores, além disso, podem ser reabsorvidos e transformados com mais facilidade que os tratados quimicamente. Apesar de apresentar diversos benefícios, os homoenxertos não ficam isentos de complicações. As mais freqüentes são a infecção no sítio operatório, a não incorporação do enxerto e a fratura do enxerto ósseo (54; 56).

Os enxertos autógenos são considerados biologicamente ideais, pois possui capacidade osteogênica, osteocondutora e osteoindutora, o que faz com que a osseointegração seja rápida e eficaz. Além disso, a não transmissibilidade de doenças infécto-contagiosas aumenta a sua condição de melhor enxerto ósseo. Como desvantagem desse tipo de enxerto está a quantidade limitada de osso que

pode ser retirada da área doadora, por vezes insuficiente para a correção de grandes perdas ósseas e o índice de complicações decorrentes de sua extração, que pode variar de 8,6% a 20,6%. Outras desvantagens são descritas: a impossibilidade da sua utilização em pacientes idosos e crianças, casos onde há a necessidade de formatos e dimensões específicos do enxerto e em situações onde cirurgias prévias eliminaram áreas potencialmente doadoras de osso (56).

A utilização de osso homólogo tornou as cirurgias mais rápidas e menos traumáticas do que quando se utiliza osso autógeno, pois não há a necessidade de acesso cirúrgico para a remoção de osso de uma área doadora (58).

Pesquisa com 42 casos de homoenxerto ósseo congelado apresentou 38 casos onde resultados clínicos radiográficos demonstraram bom aumento de volume alveolar e a taxa de reabsorção óssea semelhante na grande maioria dos casos. Nos demais, houve necessidade de nova enxertia devido à causa não especificada no artigo (58).

A seleção de doadores é um dos passos mais importantes da transferência de órgãos em seres humanos (54). Através do transplante de órgãos podem ser resolvidas várias patologias, porém existe o risco de contaminação do receptor com implantes infectados, o que é motivo de grande preocupação para todos aqueles que lidam com transplantes de órgãos em sua prática diária. Seguindo as normas da *American Association of Tissue Bank*, pacientes com doenças como a Aids, hepatite, sífilis, tuberculose, micoses ósseas, doenças metastáticas, doenças sistêmicas ou localizadas nos ossos e tecidos moles, vítimas de morte por envenenamento, grandes queimados, pacientes que permanecem com respiração assistida por mais de 72 horas, ingestão de drogas ou substâncias tóxicas são excluídos imediatamente da doação. Doadores vivos devem ficar 90 dias de quarentena do enxerto com exame para HIV no início e no final desse período e que também deve ser excluído todo o doador cadáver que tenha sido transfundido acima de seis unidades até 48 horas antes da doação (59).

Em relação ao congelamento do osso alógeno, as temperaturas em torno de 70 graus Celsius negativo diminuem marcadamente a antigenicidade dos enxertos, além de promover a preservação dos ossos por longos períodos (54). Além disso, a liofilização tem mostrado ser muito eficaz na preservação de enxertos ósseos, além de facilitar a armazenagem que pode ser feita em temperatura ambiente, entretanto os elevados custos de execução e manutenção tornam esse método mais oneroso. Da mesma forma, enxertos armazenados de três a quatro anos não apresentam qualquer diferença relacionada com o tempo de armazenamento. Os ossos podem permanecer armazenados por tempo limite de até cinco anos sem alteração em sua qualidade, desde que protegidos do ar e de contaminações (54; 56).

A utilização de enxerto de banco de ossos não é um procedimento livre de riscos devendo sempre ser avaliada a relação risco e benefício. O paciente deverá conhecer estes riscos e participar do processo de decisão (59).

Os enxertos alógenos podem ser usados na correção de defeitos ósseos, porém devido ao seu processamento para doação diminuem o seu potencial osteoindutivo. Esse estudo introduziu células tronco mesenquimais além de proteínas bioativas e suplementos osteogênicos sobre o arcabouço de osso alógeno. Como resultado, as proteínas bioativas estimularam células tronco mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos com produção de matriz extracelular e essa diferenciação aumentou com a adição de suplementos osteogênicos (55).

### **3.6 Marcadores ósseos**

Avaliando culturas osteoblásticas removidas do íliaco e dos ossos longos de pacientes com idades entre 2 e 63 anos, a função mais importante e distinguível exercida por células formadoras de osso é a elaboração e a mineralização de uma matriz extracelular que contenha colágeno tipo I e certas moléculas protéicas não-colagenosas específicas de osso (60).

O sistema de células do estroma da medula óssea é apropriado para analisar a expressão de proteínas ósseas tanto no nível populacional quanto no de célula

individual. A complexa composição celular dessas culturas permite avaliar a distribuição, a especificidade e a expressão temporal de fenótipos de marcadores osteoblásticos como fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. O envolvimento dessas proteínas na formação óssea, assim como a regulação de sua produção e ação, pode mimetizar as interações celulares que ocorrem *in vivo* durante a osteogênese (61).

Anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície celular de osteoblastos têm sido usados para caracterizar a linhagem osteogênica tanto *in vivo* como *in vitro*. Pelo isolamento e cultivo de células mesenquimais indiferenciadas removidas da medula óssea de doadores humanos, entre 28 e 46 anos de idade, as células osteogênicas precursoras originam osteoblastos maduros e, eventualmente, osteócitos, a partir de distintas etapas que iniciam com a diferenciação das células-tronco. Alguns desses anticorpos monoclonais reagem somente com a superfície de células progenitoras oriundas da medula óssea humana e jamais com osteoblastos maduros, mostrando, portanto, a possibilidade de caracterização apenas das primeiras fases da diferenciação osteoblástica. Além disso, os marcadores osteogênicos associados podem localizar e individualizar uma determinada célula dentro da seqüência do desenvolvimento osteogênico (21).

A matriz orgânica do osso é uma cadeia de proteínas bem-organizada. O principal constituinte é o colágeno tipo I. As proteínas não-colágenas compreendem quase 10% do conteúdo total de proteínas do osso. Várias dessas proteínas não-colágenas já foram identificadas, incluindo osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, decorina e biglicano. Dentre elas, somente a osteocalcina e a osteopontina são específicas para osso, enquanto as demais também estão presentes em outros tecidos não-mineralizados. Um segundo grupo de proteínas não-colágenas é formado de fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , IGF e BMP) armazenados na matriz óssea. Tais proteínas possuem efeitos celulares distintos, regulando o crescimento e a diferenciação de células sem ter um papel direto (proteínas não-colágenas) no início da formação do cristal ou no progresso e no término do processo de mineralização. Ambos os grupos das proteínas não-colágenas estão envolvidos no remodelamento ósseo durante o desenvolvimento e o

crescimento, assim como no remodelamento ósseo em adultos e na cicatrização de fraturas, sendo, portanto, potentes reguladores do metabolismo ósseo (62).

Pesquisa procurando analisar o remodelamento ósseo por meio dos marcadores osteogênicos osteocalcina e osteonectina durante a distração osteogênica em mandíbulas de coelho, verificou uma diminuição na expressão dessas proteínas, paralela a uma significativa perda de cristais em formação após o aumento da tensão distratora na região da osteotomia. Em mandíbulas de controle, sem distração ou com baixa tensão distratora, observou uma quantidade abundante de osteocalcina e osteonectina visivelmente dispersas sobre os osteóides e a linha de osteoblastos nas colunas trabeculares, sugerindo que ambas as proteínas desempenham um importante papel na diferenciação osteoblástica e mineralização de osteóides (63).

A fosfatase alcalina é um marcador das primeiras fases da formação de osteoblastos sendo também altamente positiva no meio da progressão da linhagem de osteoblastos. Além disso, a osteopontina é uma proteína produzida por osteoblastos e é um componente da mineralização da matriz extracelular durante a formação óssea, sendo muito importante na osteogênese por causa da facilidade de aderir osteoblastos a essa matriz extracelular (55).

A osteopontina (SPP1) é uma glicoproteína fosforilada pela matriz extracelular mineralizada dos osteoblastos durante o crescimento ósseo, tendo seu aumento regulado pela vitamina D. Além disso, tem um papel crucial na larga escala de formação da hidroxiapatita. Sua expressão é regulada em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular, sendo a fosfatase alcalina um de seus maiores estimulantes por estar ligada a produção de fosfato (20).

Uma variedade de anticorpos monoclonais tem sido produzida para reconhecer osteoblastos e seus distintos estágios de diferenciação, embora em alguns casos ainda existam limitações. A osteopontina já é detectável nos primeiros estágios da diferenciação durante a proliferação de precursores celulares, porém seus níveis são regulados positivamente em alguns pré-osteoblastos e estão

aumentados em osteoblastos. Já a osteocalcina, também chamada de proteína óssea Gla, é a principal proteína não-colágena de osso altamente expressa em osteoblastos maduros. Dos marcadores osteoblásticos, a osteocalcina é a mais específica e a última a ser expressa, sendo indetectável em pré-osteoblastos e abundantemente expressa somente em osteoblastos pós-mitóticos e maduros (49).

A osteocalcina (BGLAP), conhecida como ácido gama carboxi-glutâmico, é uma proteína de ligação com cálcio dependente de vitamina K, sendo descrita como um promotor e inibidor da mineralização. Essa proteína é produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea; representado 20% das proteínas de matriz não colagenosa (20).

A investigação da imunorreatividade da osteocalcina e da osteonectina no diagnóstico de osteossarcomas descreve que ambas são proteínas ósseas específicas expressas por osteoblastos. A osteocalcina e a osteonectina são proteínas ósseas humanas encontradas em abundância, cujos anticorpos específicos são empregados para diferenciação e diagnóstico de neoplasias ósseas. A osteocalcina possui alta afinidade com cristais de hidroxiapatita, além de ter papel importante na mineralização (64; 65).

Segundo pesquisa promovendo a osteoindução de células do estroma da medula óssea *in vitro* verificou-se que após o quinto dia de experimento as células mesenquimais apresentavam-se em colônias totalmente aderidas ao substrato, estando morfológicamente com filamentos e prolongamentos ao longo deste substrato formando uma rede celular. Esta diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ocorreu até o oitavo dia sendo comprovadas pela presença de osteopontina, osteonectina e osteocalcina determinando, portanto, a presença de osteoblastos maduros a partir deste dia. Desta data até o décimo quarto dia evidenciou-se o aumento da proliferação celular comprovada (1).

O fenótipo de osteoblastos maduros é caracterizado pela habilidade dessas células de sintetizar uma matriz óssea que mineralizará. Além disso, osteoblastos

expressam vários marcadores fenótipos como a fosfatase alcalina, colágeno tipo I e proteínas da matriz óssea não colágena incluindo a osteocalcina (11).

### 3.7 Fatores de crescimento

Levander (*apud* Solheim, 1998) determinou, em 1938, que um extrato alcoólico de osso induzia a formação de cartilagem e de osso ectópico quando injetado, via intramuscular em ratos, e concluiu que a regeneração óssea ocorreu, no local, como resultado da ativação de algumas substâncias formadoras de osso, a partir de células mesenquimais indiferenciadas.

Moléculas osteoindutoras são caracterizadas por sua habilidade em promover a formação óssea. As moléculas osteoindutoras, em sua grande parte, são citocinas, as quais constituem proteínas extracelulares ou peptídeos que medeiam a sinalização de uma célula para outra. As proteínas morfogenéticas ósseas e alguns fatores de crescimento e diferenciação celulares são exemplos de citocinas osteoindutoras (51).

O crescimento e a manutenção de tecido ósseo constituem um processo complexo influenciado por hormônios sistêmicos que, localmente, produzem fatores de crescimento. Além do hormônio da paratireóide, da calcitonina e da vitamina D, que são conhecidos efetores na remodelação óssea, os fatores de crescimento e transformação- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1), de crescimento e transformação- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2), de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF) e de crescimento semelhante à insulina I e à II (IGF-I e IGF-II) estão presentes, em grande quantidade, na matriz óssea. Além disso, tem sido demonstrado que essas substâncias possuem diversos efeitos no crescimento e na função de células ósseas *in vitro* (67).

O tecido ósseo contém vários fatores de crescimento e, a partir de modernas técnicas de laboratório, incluindo a tecnologia do DNA recombinante, tem sido possível, nos últimos anos, identificar vários fatores de crescimento, incluindo proteína morfogenética óssea (BMP), fatores de crescimento semelhantes às

insulinas I e II (IGF I e IGF II), fator de crescimento e transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos ácido e básico (bFGF e aFGF) (66).

### **3.7.1 Meio de cultura para indução de células indiferenciadas em células osteogênicas**

A adição de glucocorticóides, ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerolfosfato e proteínas morfogenéticas ósseas demonstram induzir a mineralização da matriz óssea em diferentes estágios de sua formação e, além disso, suas ações dependem das etapas desta diferenciação celular (18).

Um meio de cultura padronizado, somado as baixas concentrações de ácido ascórbico, dexametasona e  $\beta$ -glicerolfosfato, promove a diferenciação e indução de células tronco mesenquimais em células osteogênicas que, por conseguinte, passam a expressar fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e colágeno tipo I (20).

O tratamento com dexametasona, que é um glicocorticóide sintético, estimula a proliferação das células-tronco mesenquimais e dá um suporte na osteogênese. Fosfatos orgânicos, assim como  $\beta$ -glicerolfosfato, também dão suporte osteogênico pelo papel desempenhado na mineralização e na modulação da atividade dos osteoblastos. Com isso, fosfatos livres podem induzir mRNA e expressar proteínas de células ósseas como por exemplo a osteopontina. Já o ácido ascórbico fosfatado é comumente usado na indução osteogênica, no envolvimento tardio do aumento da atividade da fosfatase alcalina, na cultura desse tipo de células e na promoção da produção da osteocalcina e osteopontina (18; 19).

A presença de indutores osteogênicos como BMPs, ácido ascórbico, dexametasona e  $\beta$ -glicerolfosfato determinam que células mesenquimais indiferenciadas transformem-se em osteoblastos e a partir de então expressem fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e outras proteínas ósseas além de uma matriz extracelular (5; 9; 17; 19; 52).



## **METODOLOGIA**

## 4 - METODOLOGIA

---

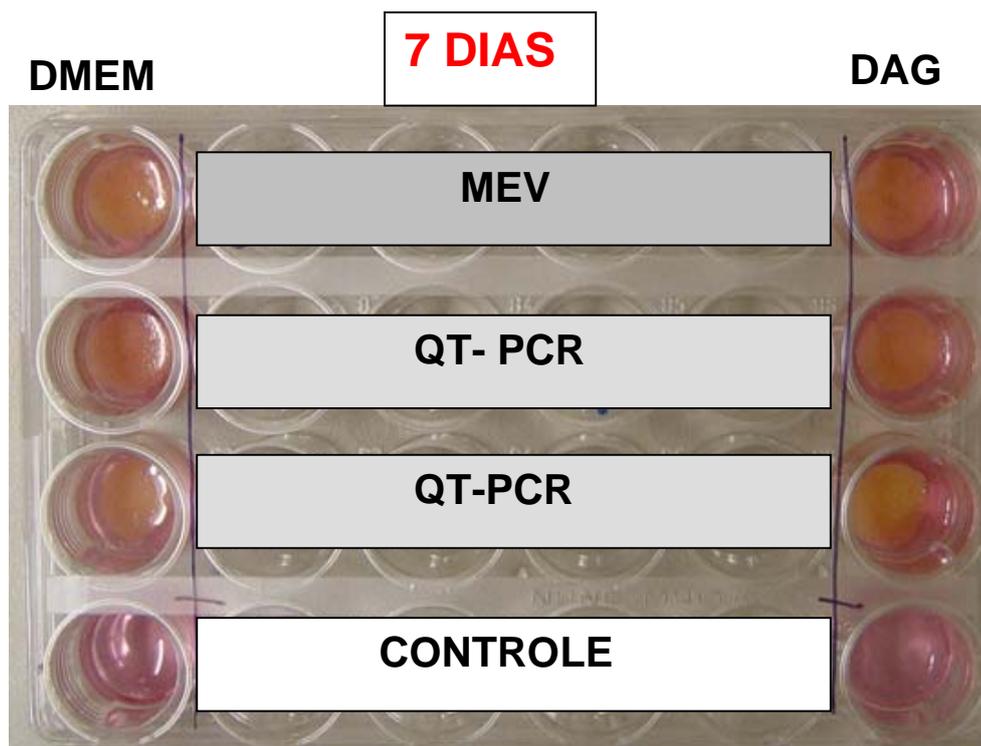
### 4.1 Aspectos bioéticos

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (*Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS; 2002*).

O projeto foi submetido à avaliação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia (protocolo número: 0015/06) em 07 de novembro de 2006 (anexos) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, dia 14 de novembro de 2007, com o registro CEP 06/03481 (anexos).

### 4.2 Grupos experimentais

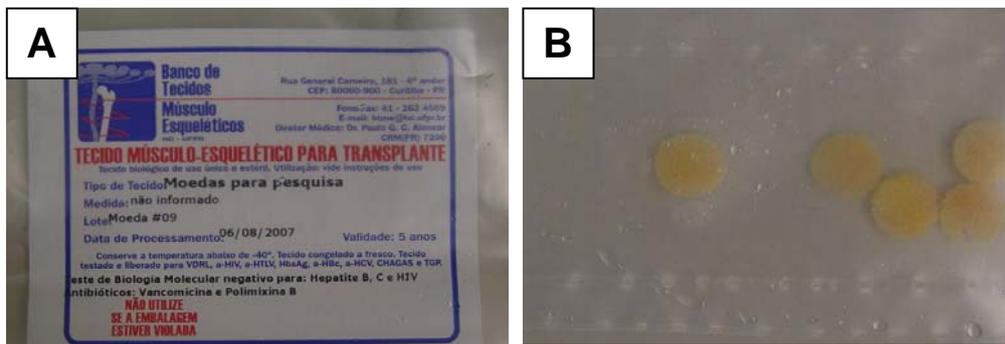
Foram selecionados dois grupos de experimento em três placas de cultura com 24 poços (Figura 1). Em cada placa, na primeira fileira vertical, nos três primeiros poços foram colocados arcabouço de osso alógeno fresco congelado (Figura 2, A e B), células tronco adultas e o meio DMEM. As células cultivadas no primeiro poço foram analisadas por MEV, as células cultivadas no segundo e terceiro poços foram analisados pela técnica da QT-PCR para quantificar a expressão dos genes. O último poço possuía apenas células tronco adultas e DMEM, para controle da proliferação e diferenciação celular. Na última fileira vertical, a disposição do arcabouço e das verificações foi a mesma, exceto o meio DMEM que foi substituído pelo meio osteogênico DAG em todos os poços. As análises foram realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias, para cada placa, respectivamente.



**Figura 1 – Diagrama esquemático dos tratamentos utilizados no estudo.** Diagrama da análise em sete dias com moedas de osso alógeno (arcabouço) associadas a células da medula óssea sem meio (DMEM) e com meio osteogênico (DAG). MEV: microscopia eletrônica de varredura; QT-PCR: PCR em tempo real; CONTROLE: células cultivadas na ausência de arcabouço de osso alógeno em meio DMEM E MEIO DAG.

### 4.3 Obtenção de osso alógeno

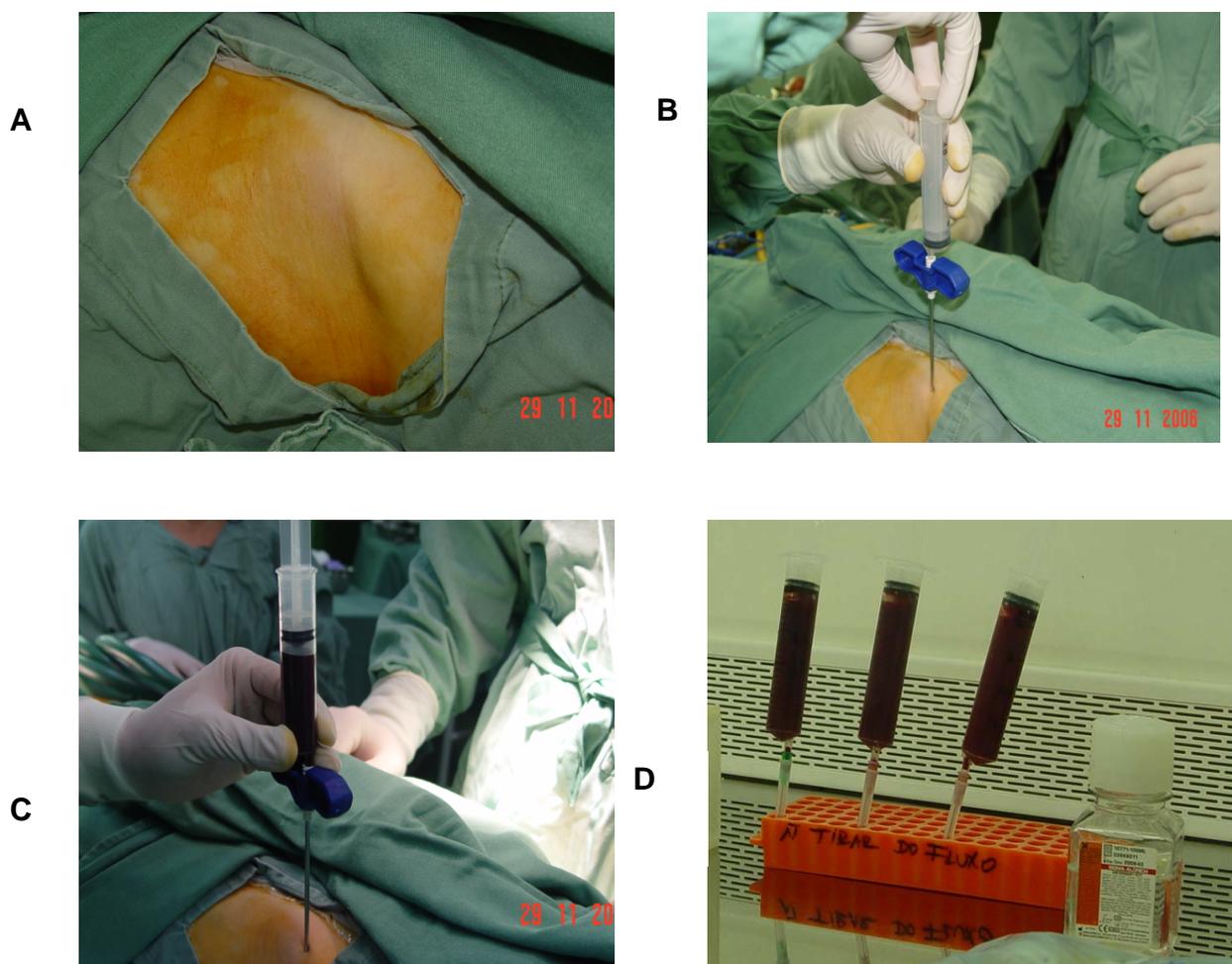
O osso alógeno foi obtido do Banco de Tecidos Músculo-Esqueléticos do Hospital de Clínicas da Universidade do Paraná (Figura 2, A e B).



**Figura 2- Osso alógeno córtico-esponjoso fresco congelado em moedas.** A) embalagem do Banco de Tecidos Músculo Esqueléticos do HC-UFPR; B) moedas de osso alógeno córtico-esponjoso com dimensões iguais de 10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura.

### 4.4 Coleta de células tronco adultas da medula óssea humana

As células da medula óssea foram obtidas de um paciente de 44 anos de idade com bom estado fisiológico durante cirurgia de reconstrução de maxila atrésica com enxerto ósseo autógeno da crista do ílaco, visando criar condições ósseas para futura colocação de implantes dentários, conforme necessidade de reabilitação bucal (Figura 3, A). A medula óssea foi aspirada da crista ilíaca do paciente com uma agulha de punção introduzida por pressão sobre a crista ilíaca, onde sobre esse instrumento foi adaptada uma seringa de 20 mL para a aspiração adequada e definitiva do material (Figura 3, B e C). Três seringas de 20 mL foram utilizadas para a obtenção da medula e logo a seguir transportadas para o Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas-PUCRS para posterior preparação das células (Figura 3, D).



**Figura 3 - Coleta de células tronco adultas da medula óssea humana oriunda da região do íliaco.** A) preparo do campo com exposição da crista íliaca; B) agulha de punção introduzida por pressão sobre a crista íliaca; C) aspiração das células tronco adultas; D) seringas de 20 mL, no fluxo, preenchidas com medula óssea humana para posterior separação das camadas de células mononucleares.

#### 4.5 Dissociações da medula óssea para obtenção de células tronco adultas

A medula óssea aspirada foi processada para a extração das células-tronco adultas. 60 mL de medula óssea foram divididos em dois tubos e lavados com 40 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) para retirada das hemácias, por 4 vezes. A suspensão foi centrifugada a  $450 \times g$  por 5 minutos. A medula óssea foi transferida para um novo tubo onde foram acrescentados 0,015% (p/v) de colagenase (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) diluída em DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) em um total de 50 mL. O tubo foi colocado em um agitador orbital e incubado a 37 °C por 60 minutos até dissociação completa do tecido. A colagenase foi inativada com meio de cultura DMEM (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) contendo 10% (v/v) de FBS (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) e a solução foi dividida em dois tubos. As células foram centrifugadas a  $1.200 \times g$  por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células encontradas no pellet foram ressuspensas em 1 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) e contadas, câmara de Neubauer (*Loptik Labor*). Após contagem das células da medula óssea, e excluindo a contagem de hemácias, uma alíquota, 100  $\mu$ L foi retirada para citometria de fluxo e o restante, 900  $\mu$ L foram semeadas em placas de cultura (*TPP* 100x200 mm).

#### 4.6 Caracterizações das populações celulares

A caracterização das populações celulares presentes na suspensão de células foi realizada pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos anti-CD34, anti-CD45, anti-CD105 e anti-CD117 em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) em uma alíquota de 100  $\mu$ L onde foi acrescentado 20  $\mu$ L de cada anticorpo (CD34/117e CD45/105).

As amostras foram incubadas com os anticorpos a 4 °C no escuro por 30 minutos. Após esse tempo, lavadas com 3 mL de DPBS e centrifugadas a  $1.200 \times g$  por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando 50  $\mu$ L de volume final. A

esse volume final foi acrescentado 1 mL de paraformaldeído em DPBS. A amostra foi analisada em até 8 horas.

#### **4.7 Cultura de células tronco mesenquimais associada a um arcabouço de osso alógeno**

As células-tronco mesenquimais são células aderentes em cultura. As células obtidas da medula óssea foram semeadas em uma densidade de  $8 \times 10^5$  a  $10^7$  e cultivadas em placas de cultura de 24 poços a 37 °C que continham cada placa um arcabouço de osso alógeno córtico-esponjoso com dimensões aproximadas de 2 mm de espessura por 10 mm de diâmetro ( Banco de Tecidos Músculo Esqueléticos do HC-UFPR, Curitiba, Brasil), em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*; Invitrogen, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Soralí Biotecnologia, BR) inativado, 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/mL, 10.000 µ/mL, Invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina (10 mg/mL, Invitrogen, USA). As culturas primárias foram observadas diariamente e, o meio de cultura trocado a cada três dias para remoção das células do sobrenadante e manutenção dessas células aderentes. Quando a população celular atingia confluência de 90%, as células eram tripsinizadas com solução de tripsina 1X (5% - EDTA 5,3 mM 10X, Gibco, USA) durante 10 minutos em estufa a 37 °C, e, logo depois de adicionado meio D-MEM contendo soro fetal bovino para inativação da tripsina seguido de centrifugação por 5 minutos, a 1.500 x g. As culturas celulares foram randomizadas por visualização, sendo padronizadas para esse experimento.

As células foram ressuspensas em meio de cultura sobre o arcabouço, onde a cultura secundária, ou também chamada cultura após 1° (primeira) passagem, foi submetida aos mesmos procedimentos de manutenção da cultura primária.

#### **4.8 Indução das células tronco mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica associadas a osso alógeno**

##### **4.8.1 Cultura de células tronco mesenquimais sobre osso alógeno em meio osteogênico (DAG)**

As células-tronco mesenquimais foram cultivadas em meio osteogênico, composto por DMEM completo acrescido de 0,1  $\mu$ M de dexametasona, 50  $\mu$ M de ácido ascórbico, 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato (DAG) após a 3<sup>a</sup> passagem, por 21 dias.

Três vezes por semana o meio de cultura (DAG) foi substituído. Como controle negativo da indução, uma cultura de células foi mantida em meio de cultura convencional (DMEM completo) pelo mesmo período de tempo.

#### **4.9 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células mesenquimais indiferenciadas sobre um arcabouço de osso alógeno com e sem meio osteogênico**

A verificação da cultura por MEV foi realizada a partir de um equipamento da marca PHILIPS, modelo XL 30 onde as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e após desidratadas em banho de acetona seriado de 30% a 100%. Por último, as amostras sofreram a aplicação de uma camada fina de ouro via *sputtering*.

#### **4.10 Extrações do RNA total das células em cultura**

A expressão do mRNA para as proteínas osteocalcina (BGLAP), osteopontina (SPP1) e fosfatase alcalina (ALP) foi detectada pela extração do RNA total das células em cultura, seguida de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (QT-PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma dessas proteínas.

##### **4.10.1 Extração do RNA total com Trizol**

O RNA total foi isolado, empregando-se uma solução de TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, USA). As células foram lavadas uma vez com 1 mL de DPBS. Após, foi adicionado 1 mL de TRIZOL LS (Invitrogen, USA) e as células foram incubadas por 7 minutos, no gelo, para destruição das membranas celular e nuclear e liberação dos ácidos nucléicos. Após o período de incubação, as suspensões foram retiradas da

placa de cultura e transferidas para um tubo Eppendorf seguida da adição de 200  $\mu\text{L}$ /tubo de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas, por 3 minutos, no gelo, e centrifugadas (Eppendorf 5417R, USA) a 12.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante (fase aquosa-incolor) foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado e incubados por 10 minutos, no gelo. As amostras foram centrifugadas, por 10 minutos, nas mesmas condições. Os precipitados foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75%, gelado, e centrifugados a 12.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1%, Invitrogen, USA) e com 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase (40 U/ $\mu\text{L}$ ; Invitrogen, USA).

A integridade do RNA total extraído das amostras foi analisada em gel de agarose 1,5%, após eletroforese em tampão TAE, contendo brometo de etídio (EtBr) e a quantificação foi verificada por espectrofotometria em comprimento de onda à 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA foi determinada utilizando-se a razão (A260/A280).

Para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I (DNase I 124 U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen, USA), a qual cliva o DNA de fitas simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. Assim, os 20  $\mu\text{L}$  de cada extração de RNA total foram digeridos com 10U da enzima em um volume final de 22  $\mu\text{L}$ . As amostras foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a enzima foi inativada pela adição de 1  $\mu\text{L}$  de 25 mM de EDTA e incubadas, por 10 minutos à 65 °C.

#### **4.11 Transcrição Reversa para obtenção do cDNA**

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, procedeu-se a uma reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA

complementar (cDNA), utilizando-se a enzima Superscript II e os oligonucleotídeos iniciadores oligos-dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen, USA). Para cada reação utilizaram-se 22 µL da extração de RNA total, 0,5 µL da enzima Superscript II (200 U/µl; Invitrogen, USA), 0,2 µL de oligos-dT<sub>12-18</sub>, 4,5 µL de DTT (0,1M; Invitrogen, USA), 4,5 µL de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 9 µL de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), e H<sub>2</sub>O-MQ até completar 45 µL de solução de reação. As reações serão incubadas no termociclador (Peltier Termocycler, MJ Research, USA) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos a 25 °C, 45 minutos a 42 °C, e 3 minutos a 99 °C. Após o término da transcrição reversa 5 U de inibidor de ribonuclease H (2 U/µl; Invitrogen, USA) foram adicionados a cada tubo e as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20 °C até o uso para a reação.

#### **4.12 PCR em tempo real (QT-PCR).**

A expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas da linhagem osteogênica, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina foi determinada pela técnica da PCR em tempo real usando o termociclador iCycler Biorad. A amplificação foi feita com 20 ng de cDNA usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) numa reação total de 25 µL. Cada amostra foi analisada em triplicatas biológicas. Esta análise foi realizada com células cultivadas em meio DAG de apenas um paciente.

As condições de QT-PCR foram: 94 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 60 °C por 35 segundos. No estágio final, 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos para determinar a curva de dissociação do produto amplificado.

Os dados ópticos foram coletados durante o passo de anelamento e a curva de dissociação foi gerada ao final de cada QT-PCR a fim de assegurar a uniformidade da reação.

Os resultados foram analisados usando o sistema de detecção de seqüência (SDS), *software* (Applied Biosystems).

A expressão da  $\beta$ -actina foi selecionada como referência por se tratar de um gene constitutivo. Para a mensuração, o valor do ciclo limiar, Ct, foi determinado pelo termociclador. Os valores de Ct dos genes de interesse, osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina foram normalizados para a expressão da  $\beta$ -actina que foi considerada 100%. E os resultados foram analisados usando o método limiar crítico comparativo,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e foram expressos em comparação com as células não tratadas.

## **RESULTADOS**

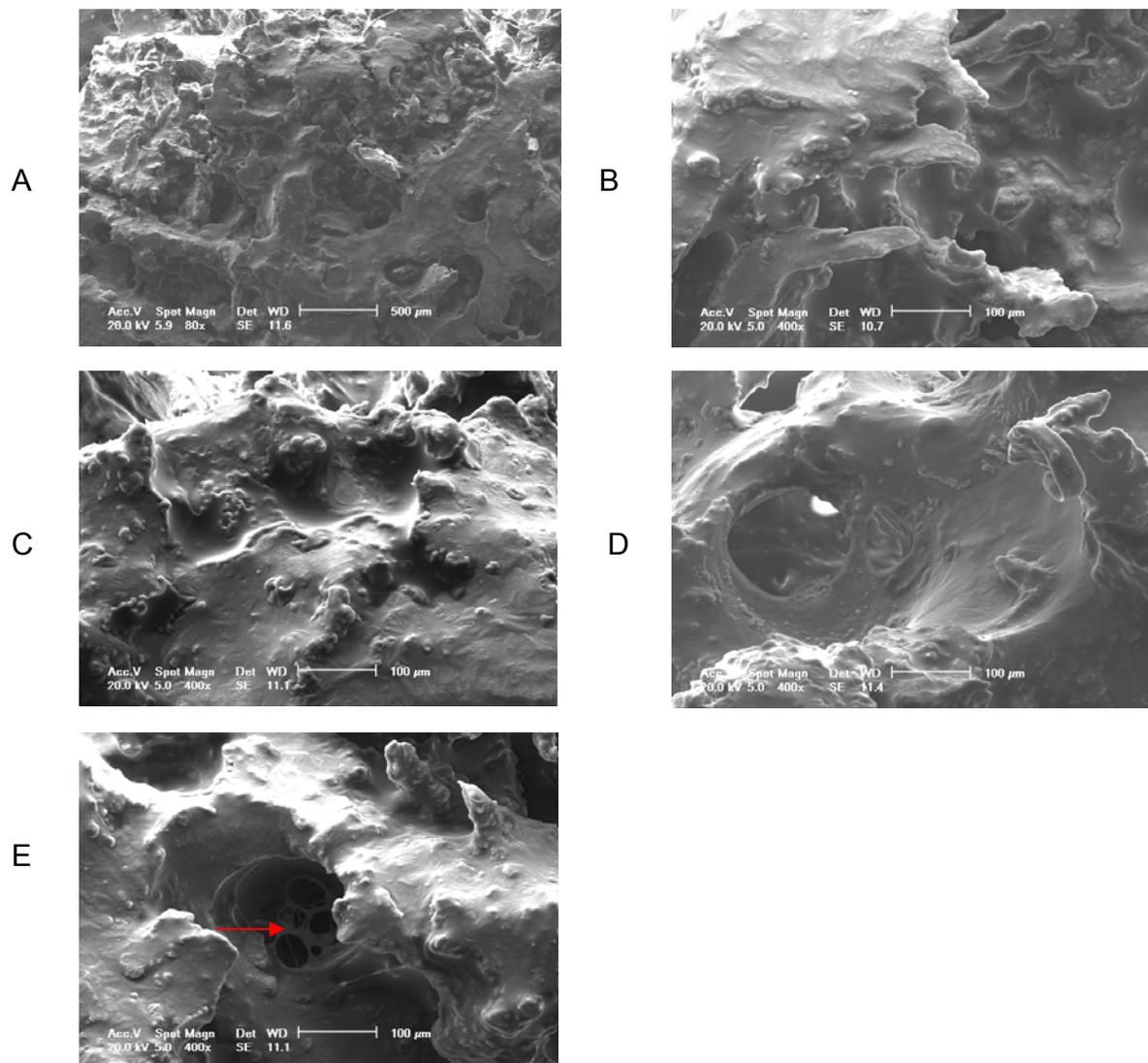
## 5 - RESULTADOS

### 5.1 Aspectos morfológicos, proliferativos e de diferenciação das células da medula óssea humana cultivadas sobre um arcabouço de osso alógeno analisadas em MEV.

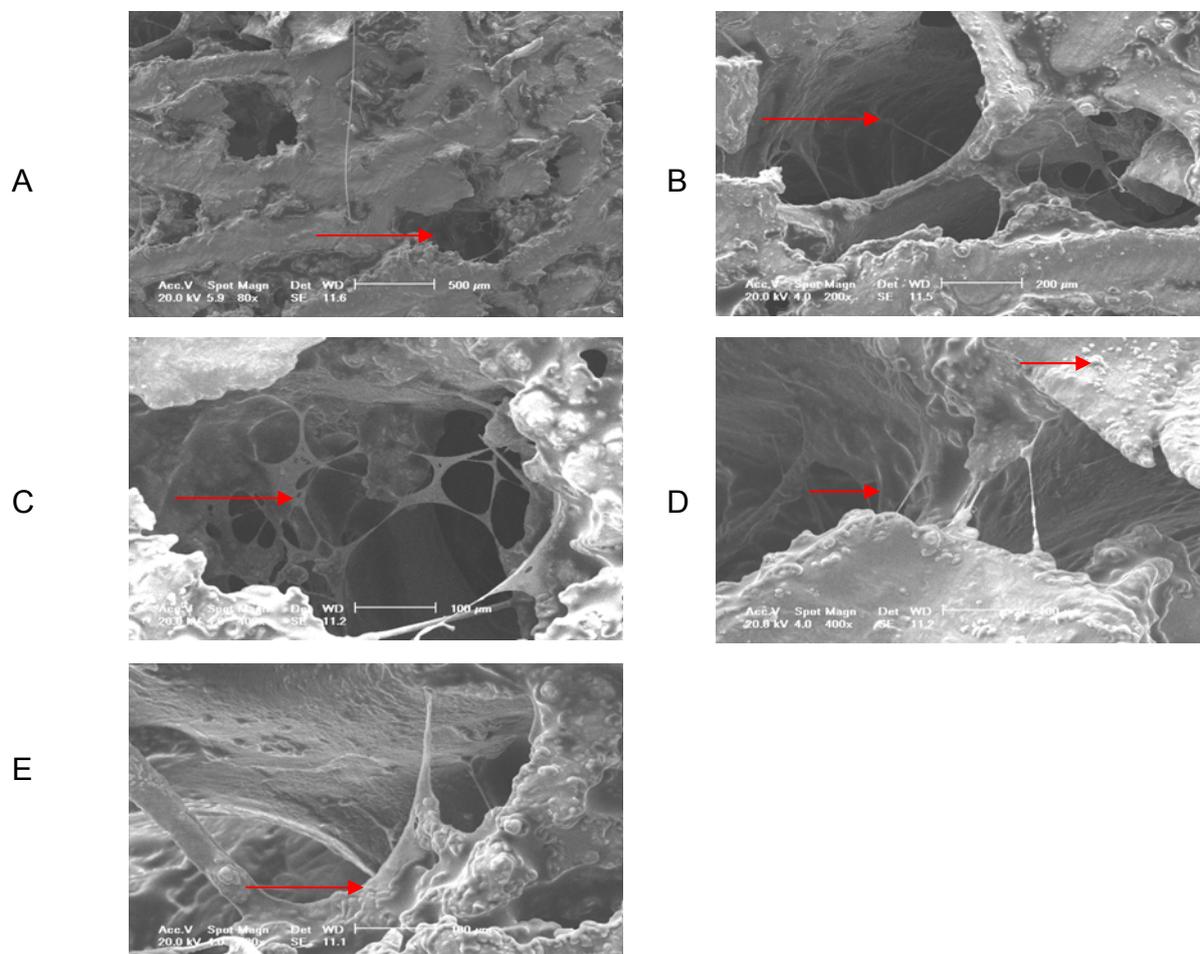
Após sete dias de cultura das células tronco adultas sobre o arcabouço de osso alógeno sem meio (DMEM) e com meio osteogênico (DAG), observa-se na cultura sem meio osteogênico poucas áreas de diferenciação e proliferação celular nos poros do trabeculado ósseo alógeno. Verifica-se apenas uma região onde se detectam prolongamentos celulares formando uma rede dentro da trabécula óssea (Figura 4, E). Nas demais trabéculas ósseas e seus tubos e também na superfície do arcabouço não foi encontrado nenhum sinal de diferenciação ou crescimento celular (Figura 4, A, B, C e D).

No entanto, na cultura com meio osteogênico observam-se filamentos e prolongamentos celulares aderidos às paredes do arcabouço envolvendo, preenchendo e interligando parcialmente os tubos das trabéculas ósseas (Figura 5. A, B, C, D e E). Na superfície do arcabouço, em algumas áreas, e também nas paredes dos túbulos aparecem algumas colônias celulares ocupando estes espaços (Figura 5: D e E).

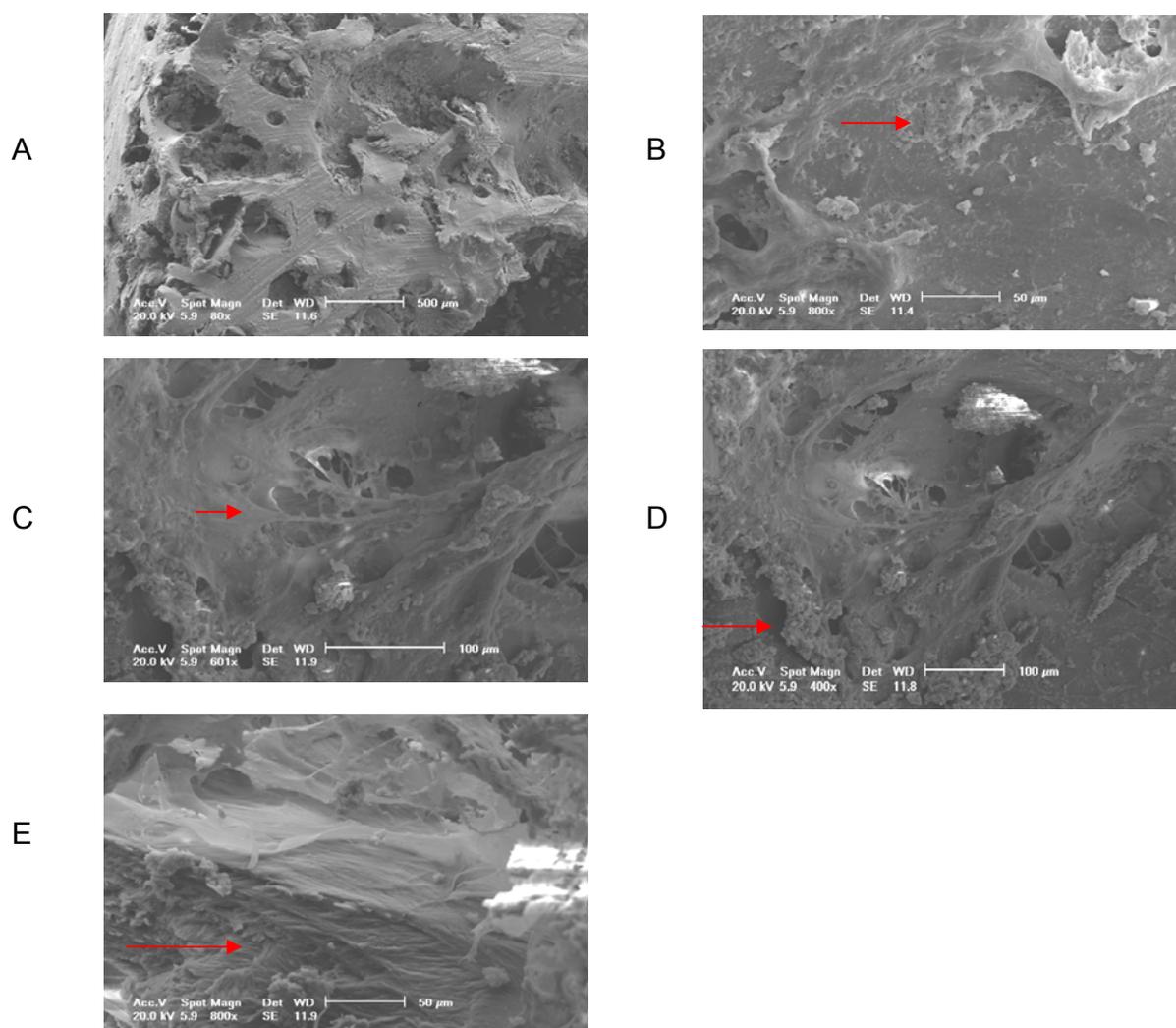
Já no décimo quarto dia de experimento, observa-se sobre o arcabouço sem e com a presença de meio osteogênico DAG, um grande e semelhante aumento na adesão, disseminação, proliferação e migração dessa rede celular composta de filamentos, prolongamentos e grumos de células dentro e sobre o osso cortiço-esponjoso de ambas as culturas, quando comparado aos resultados encontrados nos primeiros sete dias de cultura. (Figuras 6 e 7). Chama-se atenção ao fato de que sobre a cultura com meio osteogênico, na superfície do arcabouço, há a formação de colônias de células em forma de grumos aderidos a essa superfície, unidos por filamentos e extensões celulares. (Figura 7: B, C, D e E).



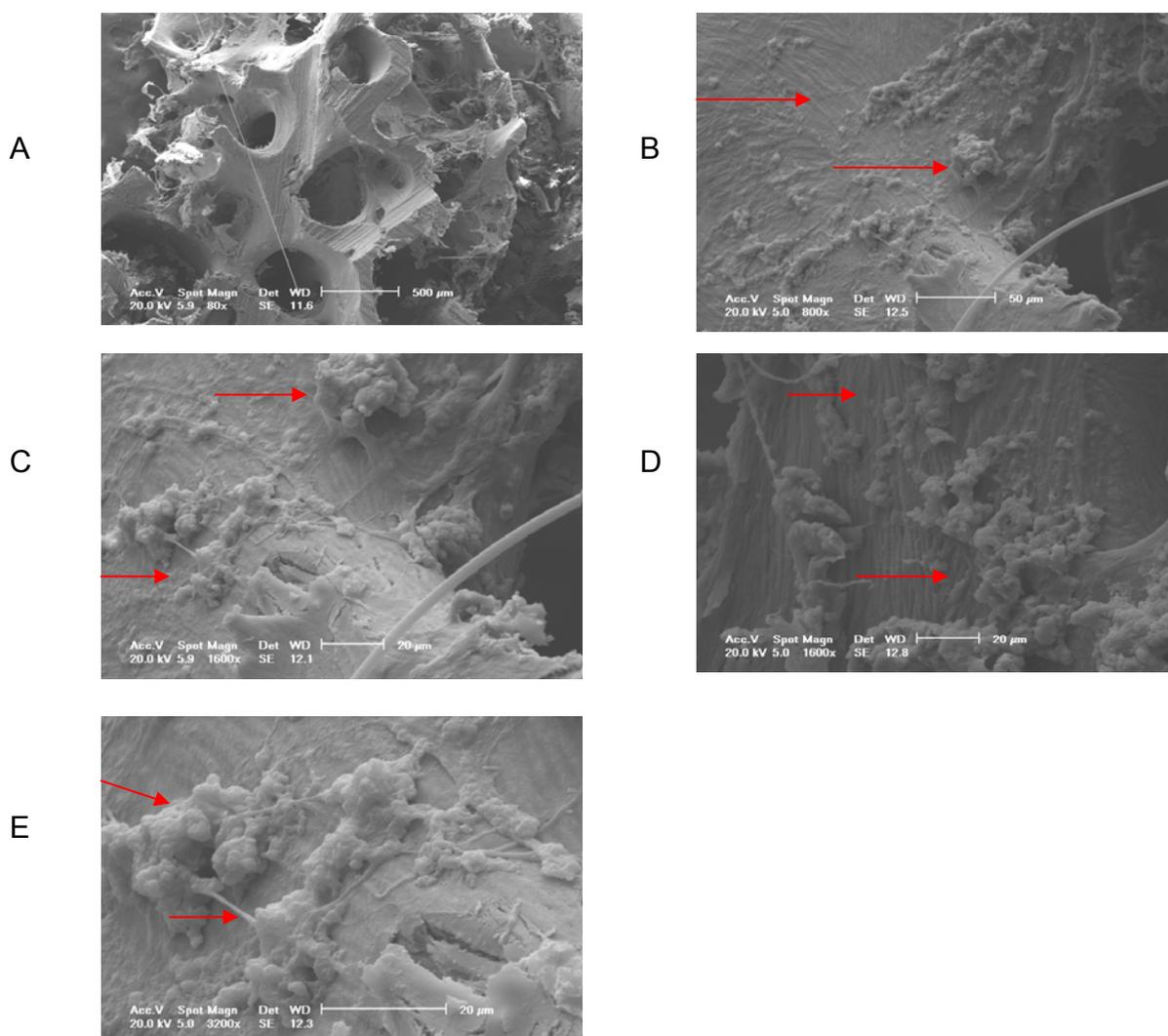
**Figura 4: Fotomicrografia eletrônica de varredura da cultura de células tronco adultas de medula óssea sobre um arcabouço de osso alógeno após sete dias sem meio osteogênico (DMEM). A) 80x; B) 400x; C) 400x; D) 400x; E) 400x. A seta em vermelho indica os prolongamentos celulares.**



**Figura 5: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com sete dias de experimento com meio osteogênico. A) 80x; B) 200x; C) 400x; D) 400x; E) 800x. As setas em vermelho indicam filamentos e prolongamentos celulares aderidos às paredes do arcabouço envolvendo, preenchendo e interligando parcialmente os tubos das trabéculas ósseas.**



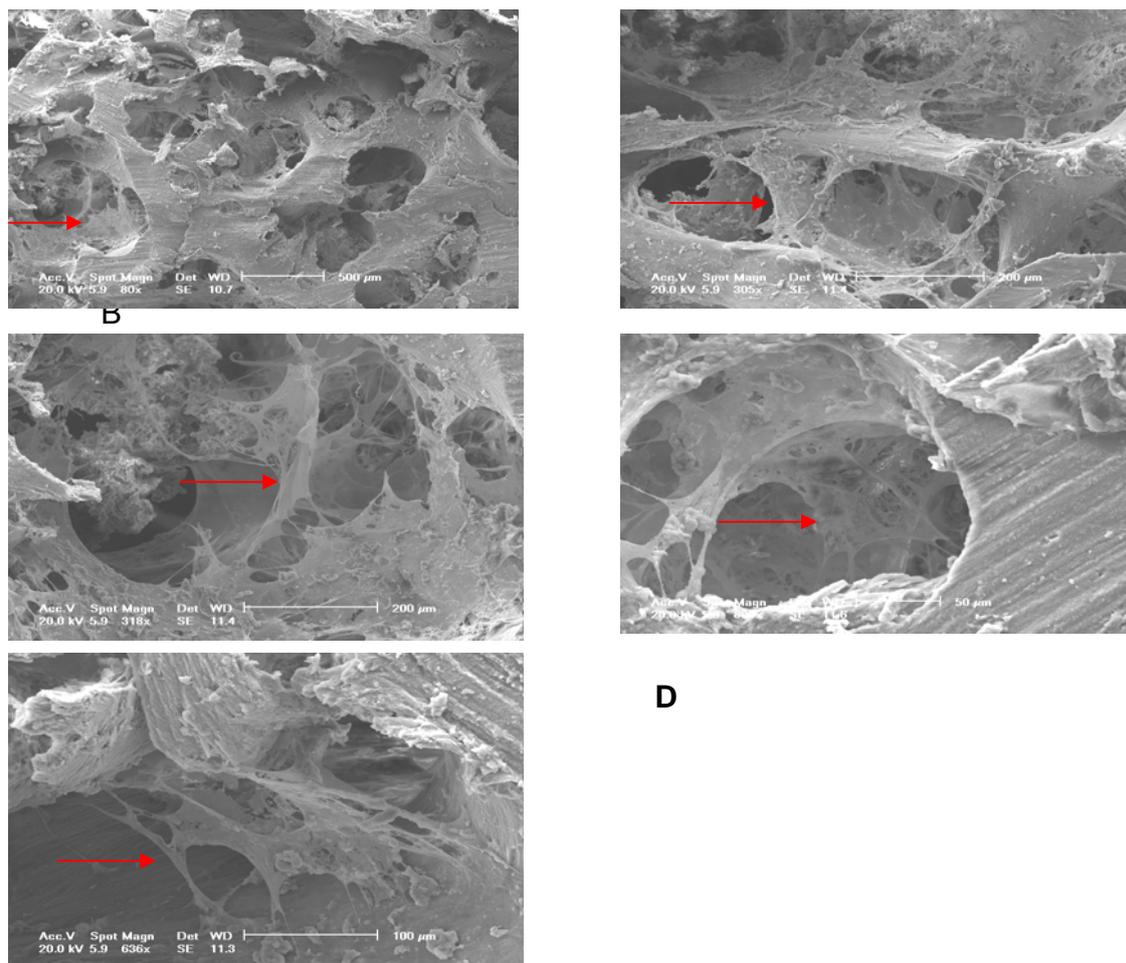
**Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com quatorze dias de experimento sem meio osteogênico. A) 80x; B) 800x; C) 601x; D) 400x; E) 800x. As setas em vermelho indicam a presença de filamentos, prolongamentos e grumos de células dentro e sobre o osso córtico-esponjoso.**



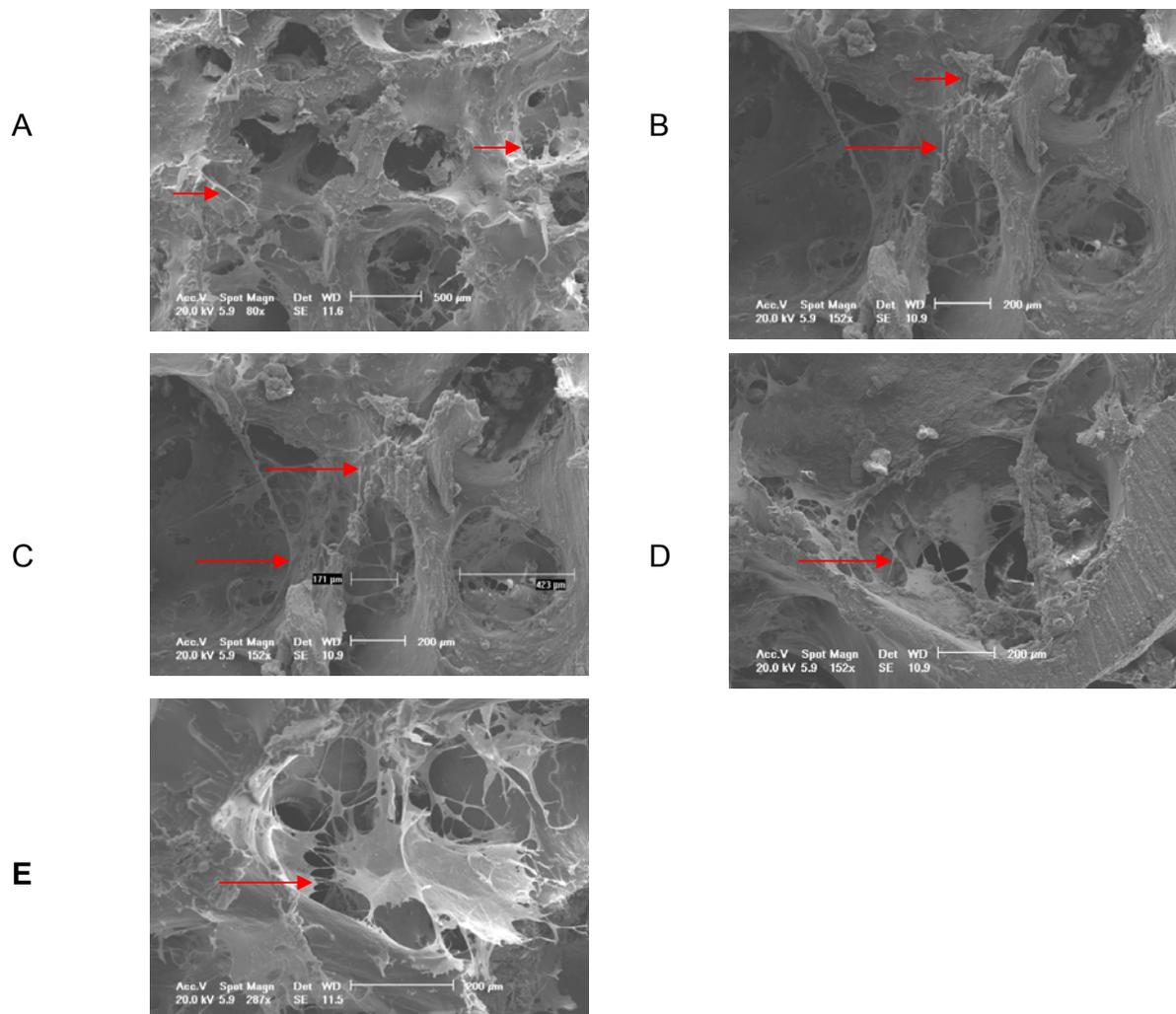
**Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com quatorze dias de experimento com meio osteogênico. A) 80x; B) 800x; C) 1000x; D) 1000x; E) 3200x. As setas em vermelho indicam a formação de colônias de células em forma de grumos aderidos à superfície, unidos por filamentos e extensões celulares.**

No vigésimo primeiro e último dia da pesquisa em ambas as culturas a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular é muito maior que em relação aos sete e quatorze dias de experimento, estando presente e ocupando todas as regiões dos arcabouços de forma semelhante e homogênea. Verificam-se

multicamadas de filamentos e colônias celulares formando também múltiplas camadas de redes e conexões celulares. (Figuras 8 e 9). As trabéculas ósseas e seus tubos estão praticamente preenchidos por esse emaranhado celular modificando inclusive a morfologia da superfície dos arcabouços com e sem meio osteogênico (figura 8: E e 9, D e E).



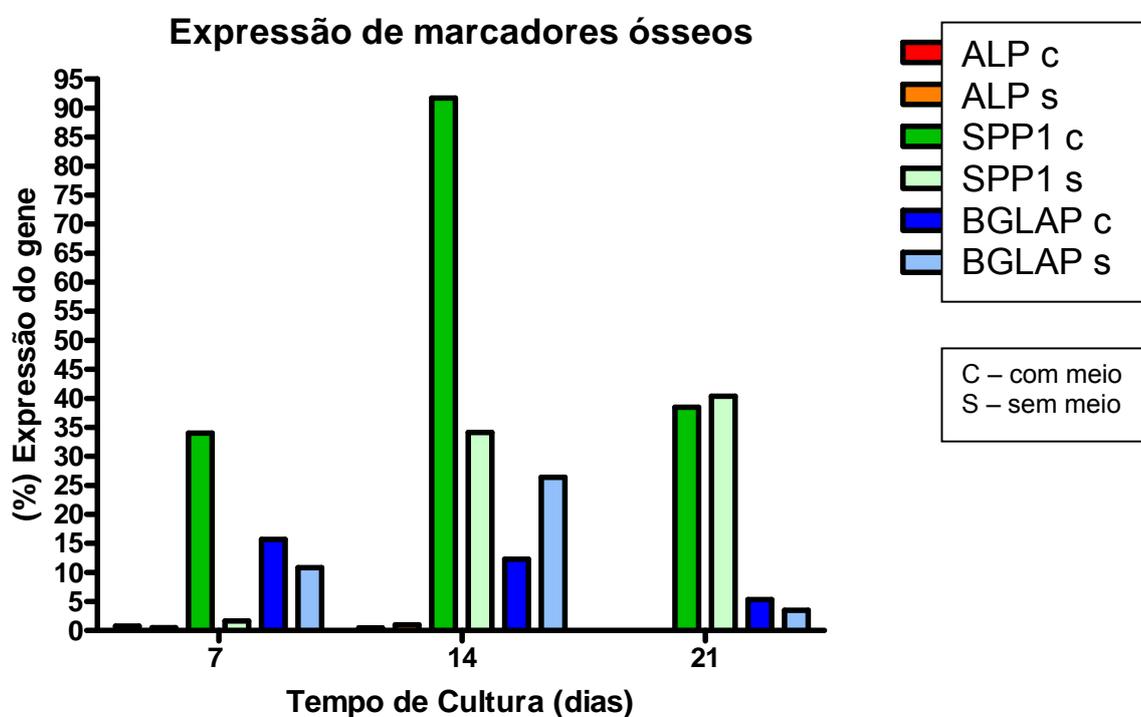
**Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com vinte e um dias de experimento sem meio osteogênico. A) 80x; B) 306x; C) 318x; D) 636x; E) 636x. As setas em vermelho indicam multicamadas de filamentos e colônias celulares formando também múltiplas camadas de redes e conexões celulares.**



**Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura de um arcabouço de osso alógeno com vinte e um dias de experimento com meio osteogênico.. A) 80x; B) 152x; C) 152x; D) 152x; E) 287x. As setas em vermelho indicam multicamadas de filamentos e colônias celulares formando também múltiplas camadas de redes e conexões celulares.**

## 5.2 Expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas osteopontina (SPP1), osteocalcina (BGLAP) e fosfatase alcalina (ALP) utilizando a técnica da PCR em tempo real.

Os genes representativos envolvidos na diferenciação osteogênica (BGLAP, SPP1 e ALP) foram selecionados para análise. Foi avaliada a expressão dos genes em células tratadas com o meio de indução osteogênica (DAG) e em células não tratadas com meio DAG, comparadas com a expressão do gene endógeno de referência ( $\beta$ -actina) (Figuras 11, 12, 13 e 14).



**Figura 10:** Histograma da expressão dos genes das proteínas fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina sem meio e com meio osteogênico (DAG) em 7, 14 e 21 dias, quantificadas por PCR em tempo real. A expressão do gene foi normalizada com o gene endógeno  $\beta$ -actina.

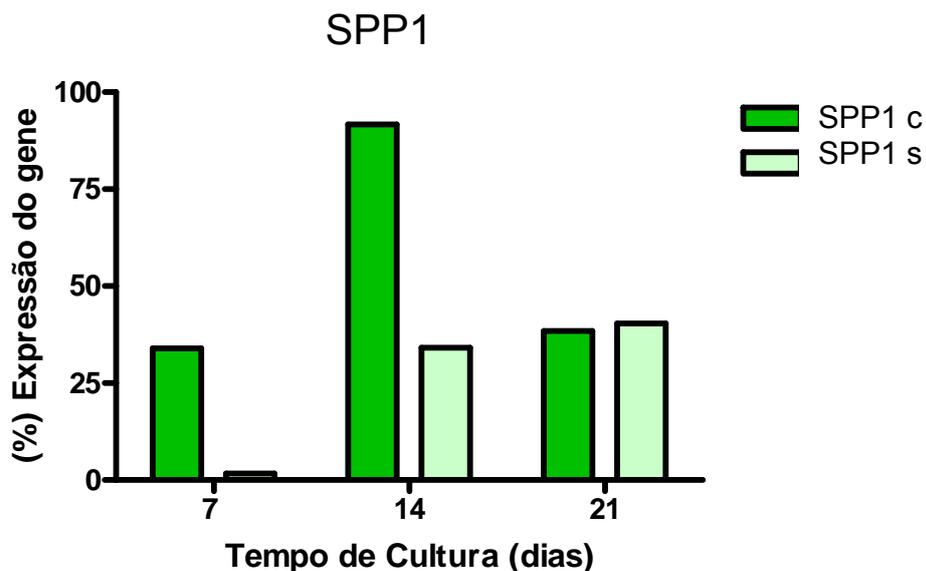


Figura 11: A expressão do gene SPP1 com meio osteogênico (SPP1c) e sem meio osteogênico (SPP1s) foi quantificada por PCR em tempo real em células-tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas. A expressão do gene foi normalizada com o gene endógeno  $\beta$ -actina.

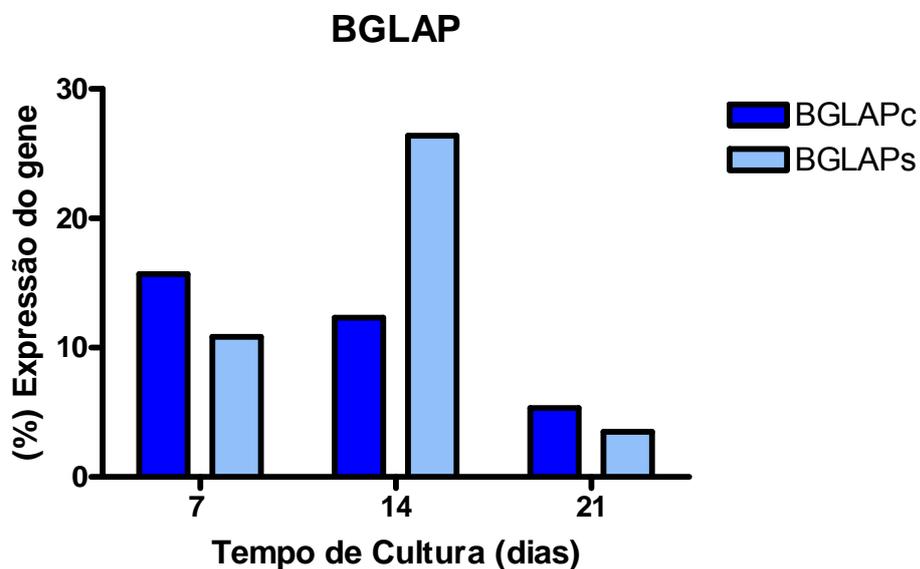
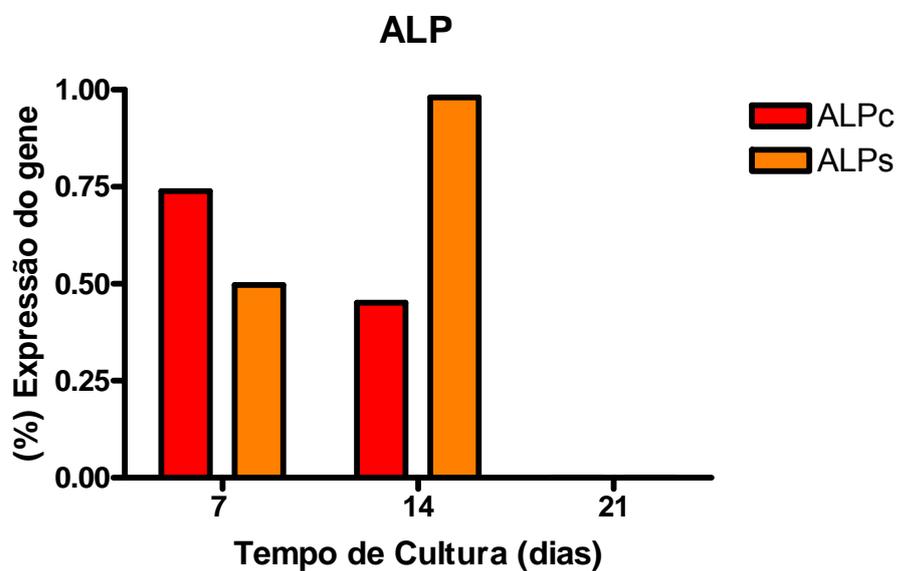


Figura 12: A expressão do gene BGLAP com meio osteogênico (BGLAPc) e sem meio osteogênico (BGLAPs) foi quantificada por PCR em tempo real em células-tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas. A expressão do gene foi normalizada com o gene endógeno  $\beta$ -actina.



**Figura 13** A expressão do gene ALP com meio osteogênico (ALPc) e sem meio osteogênico (ALPs) foi quantificada por PCR em tempo real em células-tronco mesenquimais (MSCs) induzidas em meio controle e em meio osteogênico (DAG) por três semanas. A expressão do gene foi normalizada com o gene endógeno  $\beta$ -actina.

## **DISCUSSÃO**

## 6 - DISCUSSÃO

O osso autógeno é o melhor tipo de enxerto para a reposição de falhas ósseas procurando criar condições necessárias para a obtenção de sucesso cirúrgico e protético no que tange função e estética frente a reabilitações bucais com implantes dentários, sequelas de traumas ou patologias. Sua capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora é um grande diferencial de qualidade quando comparado a outros tipos de enxertos.

No entanto, a morbidade cirúrgica associada ao tempo cirúrgico tem sido um limitador no momento da indicação e aceitação por parte dos pacientes pelos enxertos autógenos intrabucais e extrabucais. Além disso, em muitas situações necessitamos de uma grande quantidade de osso para reconstruirmos satisfatoriamente áreas defeituosas e, por conseguinte, por ter limitações quanto a quantidade de osso autógeno disponível para uma adequada reabilitação bucal, tem-se buscado alternativas dentro da engenharia tecidual associada ou não a substitutos ósseos.

A busca por alternativas reabilitadoras de osso minimamente invasivas, seguras e de qualidade é uma realidade e vem sendo testadas em pesquisas em diversos centros de bioengenharia espalhados pelo mundo. A tentativa de associação de células tronco adultas, induzidas para a formação de osteogênese, e um arcabouço que se assemelhe o mais próximo com a micro e macroestrutura do tecido ósseo e sua fisiologia, além de propiciar condições para a angiogênese, responsável pela nutrição do enxerto, é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea.

Nessa pesquisa *in vitro* a idéia foi buscar, portanto, um arcabouço de origem humana com características morfológicas semelhantes ao tecido ósseo. O osso alógeno fresco congelado preenche estas considerações e, além disso, vem sendo utilizado de maneira crescente nas reconstruções ósseas como alternativa aos enxertos autógenos (54; 55; 56). A característica de ser apenas fresco e congelado

também mantém a sua capacidade osteocondutora e osteoindutora, transformando-o assim, em um arcabouço apropriado, dentro da bioengenharia para a formação óssea mesmo sem a presença de um meio osteogênico. Estes fatos foram verificados e confirmados a partir do décimo quarto dia na cultura sem meio DAG, visto que nesse momento e nessa cultura, há uma adesão, proliferação e diferenciação celular óssea aumentada e semelhante, se comparada com o sétimo dia de cultura na análise em MEV. Cabe salientar que a formação óssea verificada na figura 8 avaliada em MEV, correspondente a vinte e um dias de experimento sem meio DAG, reforça o pensamento de que o arcabouço de osso alógeno possui essa capacidade de osteocondução e osteoindução.

Os resultados obtidos referindo-se ao arcabouço de osso alógeno fresco congelado, confirmam as citações de Alsberg, Hill e Mooney (2001), Abukawa e colaboradores (2003), Meyer, Joos e Wiesmann (2004), Meyer, Weismann e Joos (2004), Meyer e colaboradores (2005) e Chim e colaboradores (2006), que enfatizam a necessidade dessa peça ter um desenho, composição química, tamanho dos poros semelhante a área receptora, fornecer osteocondutividade, não ser tóxico, ser biodegradável e possibilitar a sua integração ao tecido adjacente.

Além das particularidades do osso alógeno fresco congelado a sua escolha também se deveu ao fato de que o seu congelamento, diferentemente da liofilização e da esterilização, preserva um pouco das propriedades de osteoindução (perdidas em grande parte no processamento do osso para doação) e principalmente mantém a osteocondução. Tais afirmações puderam ser comprovadas ao longo dos dias, 7, 14 e 21, pois como já descrito anteriormente a adesão, proliferação e diferenciação celular em osteoblastos ocorreu até nas culturas sem meio osteogênico (54; 56; 57; 58).

Em relação aos aspectos morfológicos e proliferativos das células da medula óssea humana, associados a um arcabouço de osso alógeno analisadas em MEV (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10) verificou-se que a arquitetura cheia de tubos (poros) e interligações entre estes canais do arcabouço, se assemelha com tecido ósseo córtico-esponjoso humano normal, comprovando a eficácia desse tipo de arcabouço

quanto a sua morfologia (55) e favorecendo assim uma grande penetração celular ao longo de todo o corpo da peça, permitindo uma formação óssea uniforme e uma boa perfusão para a penetração de oxigênio e do meio de cultura associado. Neste caso, as células tronco adultas e o meio osteogênico (9).

Com a análise em MEV dos aspectos morfológicos, proliferativos e de diferenciação das células da medula óssea humana, associadas a um arcabouço de osso alógeno com meio e sem meio osteogênico foi possível determinar a importância do meio osteogênico DAG sobre o crescimento e diferenciação das células em questão, assim como um auxiliar importante nos primeiros quatorze dias de experimento por sua capacidade de acelerar a adesão, migração e diferenciação das células do estroma da medula óssea em células osteogênicas e a seguir, em osteoblastos (Figuras 5 e 7) (5; 14; 19; 20; 52; 55). Estes resultados reforçam a idéia de que o meio osteogênico associado ao arcabouço é muito importante no início da osteogênese, pois ao acelerar a proliferação e diferenciação de células tronco adultas em células da linhagem osteoblástica evita a formação e crescimento de outras linhagens celulares.

Dessa forma, as reconstruções ósseas dos maxilares com osso de banco, mais especificamente osso alógeno fresco congelado, podem melhorar a qualidade do tecido ósseo conseguido ao associarmos a este arcabouço células tronco adultas e um meio osteogênico (DAG) previamente a cirurgias reconstrutivas.

No vigésimo primeiro dia, em ambos os arcabouços há uma similaridade na adesão, proliferação e diferenciação celular, o que leva a crer que a partir desse período o poder osteocondutivo e osteoindutivo (54; 56; 57; 58) do osso alógeno fresco congelado equilibrou a velocidade e qualidade da formação óssea (figuras 9 e 10).

Na análise da MEV verifica-se que o crescimento e a diferenciação celular acontecem no sétimo dia no arcabouço com meio osteogênico, através de prolongamentos e filamentos celulares aderidos às paredes do arcabouço envolvendo, preenchendo e interligando parcialmente os tubos das trabéculas

ósseas, além do aparecimento de algumas colônias celulares na superfície do arcabouço (Figura 6). Aubin, (1998), Yamamoto, Furuya e Hanada (2002) e Meyer, Joos e Wiesmann (2004) em seus trabalhos envolvendo a indução óssea a partir de células tronco adultas oriundas do estroma da medula óssea, chegaram a essas diversidades morfológicas que caracterizam os osteoblastos e representam segundo Luria (1987) e Loro (2002) distintos estágios da maturação de células osteoprogenitoras até a sua mineralização.

O aumento significativo e semelhante na adesão, disseminação, proliferação e migração dessa rede celular composta de filamentos, prolongamentos e grumos de células dentro do osso esponjoso, de ambas as culturas no décimo quarto dia, já representa o aumento da maturidade celular dos osteoblastos e seus morfotipos, sendo um grande indicativo da mineralização óssea (Figuras 7 e 8). Acrescendo a essas constatações importantes, chama a atenção o numero acentuado de nódulos ósseos (18; 40) interligados entre si por filamentos sobre a superfície, principalmente da cultura com meio osteogênico (Figura 7) sendo mais uma prova do último estágio da proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos maduros.

O crescimento, adesão e diferenciação celular foi intenso no vigésimo primeiro dia (quando comparado aos dias anteriores da análise). Redes de células achatadas e finas, ricas em prolongamentos (18; 40) praticamente envolveram por completo os arcabouços tanto em sua superfície, como principalmente em seus tubos (Figuras 9 e 10) demonstrando ser um estágio muito avançado do processo de maturação e mineralização osteóide.

Frente a expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas da linhagem osteogênica, osteopontina (SPP1), osteocalcina (BGLAP) e fosfatase alcalina (ALP) utilizando a técnica da PCR em tempo real, algumas considerações são importantes e interligam-se com os resultados obtidos e discutidos na MEV. O aumento na adesão, proliferação e diferenciação celular com a presença de nódulos ósseos e um emaranhado celular sobre os poros do arcabouço no décimo quarto dia de cultura com meio osteogênico (Figura 8), representa no RT-PCR uma expressão

elevada de osteopontina (Figura 11 e 12) o que converge com as afirmações de Lemos (2008) e Rust e colaboradores (2007) sobre a expressão dessa proteína em fases intermediárias (pré-osteoblastos) e osteoblastos. Quanto ao sétimo dia da análise da osteopontina com meio DAG, chama-se atenção ao fato que tal proteína já apresenta bom nível de expressão enquanto que na cultura sem meio ela é mínima (Figura 11 e 12). E ao comparar com o MEV nesta data (Figura 6), verifica-se a diferenciação osteogênica e a presença de osteoblastos ainda em maturação na cultura com DAG, enquanto que na cultura sem meio, ainda não há crescimento e diferenciação celular óssea (Figura 5). Sendo assim, a osteopontina por ser juntamente com a osteocalcina a única proteína específica para osso (62), fica claro que já no dia sete do experimento, na cultura onde há meio osteogênico, já existe a presença de células da linhagem osteoblástica (pré-osteoblastos) e osteoblastos em processo de maturação (21). Já no vigésimo primeiro dia de pesquisa a expressão da osteopontina na cultura com meio diminui a níveis semelhantes aos encontrados no sétimo dia, estando também a cultura sem meio osteogênico com nível de expressão parecido e estabilizado desde o décimo quarto dia. Estes dados esclarecem que mesmo no arcabouço sem meio, no décimo quarto dia, já há presença de osteoblastos e que após essa data, há uma estabilização dos níveis de expressão dessa proteína, o que não significa que a diferenciação e a mineralização óssea esteja encerrada, e sim pelo fato que essa proteína apesar de estar presente nos últimos estágios da maturação osteoblástica (21), não é tão específica para a finalização da mineralização óssea como a osteocalcina, que é a última a ser expressa no processo osteogênico (20; 49; 64; 65).

Em relação à expressão de osteocalcina (Figura 11 e 13) observa-se que no primeiro dia da análise (sétimo dia) ocorre o maior nível de sua expressão na cultura com meio osteogênico e que a mesma vai diminuindo gradualmente até o vigésimo primeiro dia da pesquisa. Como afirma Lemos (2008), não há uma resposta concreta em qual momento ela se expressa em maior quantidade durante as fases finais da osteogênese e mineralização osteóide. O importante é que se trata da principal proteína não-colágena de osso sendo altamente expressa em osteoblastos maduros, fundamental na mineralização e não detectada em fases intermediárias da formação óssea, inclusive em pré-osteoblastos. Sendo assim, fica claro que nessa pesquisa a

produção de osteoblastos e maturação óssea já acontece desde a primeira verificação no sétimo dia. Quanto a uma comparação com a MEV nos três dias de análise e independentemente das culturas com ou sem meio DAG, não foi possível chegar a fatos conclusivos visto que como já mencionado anteriormente, há um aumento considerável de proliferação e principalmente diferenciação celular óssea na MEV ao longo dos dias do estudo. Cabe também salientar, que o aumento considerável da expressão de osteocalcina no décimo quarto dia na cultura sem meio osteogênico, se comparada com a cultura com meio, e também referente aos outros dias da expressão da osteocalcina, não apresentou dados conclusivos sugerindo-se, portanto, novos estudos utilizando essa metodologia para melhores esclarecimentos quanto a sua expressão. Além disso, tanto no dia sete como vinte e um, a expressão dessa proteína foi maior nos corpos com meio osteogênico.

A fosfatase alcalina é também, de acordo com as citações de vários autores, dentre eles Handschel e colaboradores (2006) e Malaval e colaboradores (1994), um bom marcador de osteoblastos estando presente, portanto, durante a osteogênese. Por esta razão a investigação dessa proteína foi incluída na pesquisa embora a presença da osteopontina e osteocalcina, já supracitadas e classificadas como as únicas específicas para osso, preenchem os fatores necessários para a avaliação do desenvolvimento das células ósseas e de sua maturação. Apesar de a fosfatase alcalina ter sido expressa (figura 13), seus níveis de expressão foram muito baixos se comparados com as demais proteínas (figura 11) e, além disso, ausentes no vigésimo primeiro dia de estudo, tanto nos corpos com meio, como nos corpos sem meio DAG. Esta ausência de expressão, nessa data, pode ir ao encontro da pesquisa de Rust e colaboradores (2007), que enfatiza que a ALP está envolvida nas fases iniciais e medianas do desenvolvimento de osteoblastos. No entanto, esses resultados não trouxeram qualificação para uma análise mais detalhada e passível de conclusão sugerindo-se também mais investigações quanto à expressão dessa proteína.

A coleta de células tronco mesenquimais a partir das células do estroma da medula óssea humana na região da crista ilíaca não ocorreu por ser essa região uma das principais na extração de células tronco adultas (11, 12, 30, 31, 36, 37). Sua

remoção e utilização ocorreram devido a uma cirurgia de reconstrução óssea maxilar com necessidade de retirada de uma porção de osso da crista ilíaca para a correção e tratamento de atrofia maxilar severa. Atualmente, pesquisas têm demonstrado que o tecido adiposo a partir da técnica cirúrgica de lipoaspiração, também apresenta um excelente e vantajoso meio de coleta, pois diminui a morbidade cirúrgica e pode apresentar uma concentração bem maior de células tronco do que na medula óssea (20).

Considerando a preferência pela utilização de células tronco adultas de paciente adulto jovem, cabe enfatizar que embora durante toda a vida o paciente possua células tronco pluripotentes, essas células vão reduzindo populacionalmente, em capacidade e potencial de migração, proliferação e diferenciação celular e tecidual, portanto, sugere-se que estudos semelhantes de bioengenharia óssea sejam desenvolvidos com pacientes dessa faixa etária (1, 11, 18, 25, 39).

## **CONCLUSÕES**

## 7 - CONCLUSÕES

---

Com o estudo *in vitro* de culturas de células tronco adultas da medula óssea humana avaliando o papel de um arcabouço de osso alógeno e de um meio osteogênico, concluiu-se que:

- As células derivadas da medula óssea humana aderiram, migraram, cresceram, proliferaram e se diferenciaram quando cultivadas sobre um arcabouço de osso alógeno;
- O meio osteogênico acelerou a adesão, migração, crescimento, proliferação e diferenciação das células tronco adultas em células da linhagem osteogênica, principalmente nos primeiros quatorze dias, quando comparado com as culturas sem meio contendo DAG. Após este período o processo da formação e mineralização de tecido ósseo parecem ser independentes do meio de cultura.
- A diferenciação das células de medula óssea humana cultivadas sobre um arcabouço de osso alógeno na linhagem osteogênica parece ocorrer mesmo sem adição de fatores osteoindutores somente após duas semanas em cultura;
- O arcabouço de osso alógeno parece apresentar as propriedades de osteocondução e a osteoindução sugerido pela aderência e diferenciação celular.

## **REFERÊNCIAS**

## 8 - REFERÊNCIAS

---

- 1.Loro RCD. Estudo *in vitro* da osteoindução de células da medula óssea humana [Dissertação], Porto Alegre (RS): PUCRS; 2002.
- 2.Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. *Implant Dent.* 2003;12(3): 217-26.
- 3.Petrungaro PS, Amar S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. *Implant Dent.* 2005;14(2):139-48.
- 4.Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28(3):232-7.
- 5.Jiang X, Gittens SA, Chang Q, Zhang X, Chen C, Zhang Z. The use of tissue-engineered bone with human bone morphogenetic protein-4-modified bone-marrow stromal cells in repairing mandibular defects in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac.Surg.* 2006;35:1133-39.
- 6.Oh JH, Zöller JE, Kübler A. A new bone banking technique to maintain osteoblast viability in frozen human iliac cancellous bone. *Cryobiology.* 2002;44(3):279-87.
- 7.Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(6):531-7.
- 8.Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(1):64-75.
- 9.Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(1):94-100.
- 10.Kale S, Long MW. Osteopoiesis: the early development of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2000;10(3-4):259-71.
- 11.Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kübler NR, Meyer U. Cell-based bone reconstruction therapies: cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(6):890-8.

12. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27(3):677-90.
13. De Kok IJ, Drapeau SJ, Young R, Cooper LF. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(4):511-8.
14. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(4):325-32.
15. Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292(1):144-52.
16. Barboza E, Caúla A, Machado F. Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Implant Dent.* 1999;8(4):360-7.
17. Meyer U, Wiesmann HP, Joos U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(6):523-30.
18. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(7):635-41.
19. Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater.* 2005;9:39-49.
20. Lemos MA. Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica [dissertação], Porto Alegre (RS): PUCRS; 2008.
21. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997;21(3):225-35.
22. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science.* 1983;220(4598):680-6.
23. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Rel Res.* 1991(263):30-48.
24. Gray C, Boyde A, Jones S. The isolation, culture, and function assay of osteoclasts and osteoblasts. In: Celis JE, Carter N, Simons K, Small JV, Hunter T, Shotton D, editors. *Cell biology: a laboratory handbook.* 2<sup>nd</sup>.ed. San Diego: Academic Press; 1994. p.142-8.
25. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000;113(7):1161-6.

- 26.Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med*. 2002;4(20):1-11.
- 27.Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
- 28.Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8(1):11-20.
- 29.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(5411):143-7.
- 30.Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(2):165-81.
- 31.Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000;18(9):959-63.
- 32.Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72(3):396-410.
- 33.Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2000;29(1):62-6.
- 34.Young HE, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec*. 2001;264(1):51-62.
- 35.Turgeman G, Pittman DD, Müller R, Kurkalli BG, Zhou S, Pelled G, et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*. 2001;3(3):240-51.
- 36.Kim KJ, Itoh T, Kotake S. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1997;35(3):279-85.
- 37.Thalmeier K, Meissner P, Moosmann S, Sagebiel S, Wiest I, Huss R. Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice. *Acta Haematol*. 2001;105(3):159-65.
- 38.Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*. 2002;30(5):699-704.
- 39.Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*. 2002(395):66-80.

40. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998a;76(6):899-910.
41. Luria EA, Owen ME, Friedenstien AJ, Morris JF, Kuznetsow SA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res.* 1987;248(2):449-54.
42. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 1999;74(4):616-27.
43. Joyner CJ, Bennett A, Triffitt JT. Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone.* 1997;21(1):1-6.
44. Nagai N, Qin CL, Nagatsuka H, Inoue M, Ishiwari Y. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28(2):143-50.
45. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.
46. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21(7):667-81.
47. Murata M, Inoue M, Arisue M, Kuboki Y, Nagai N. Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27(5):391-6.
48. Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(4):509-15.
49. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 1998b;30-31:73-82.
50. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(6):940-56.
51. Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop Relat Res.* 2002(395):33-43.
52. Chim H, Hutmacher DW, Chou AM, Oliveira AL, Reis RL, Lim TC, et al. A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(10):928-34.
53. Ellis E 3rd, Sinn DP. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51(11):1181-93.
54. Jesus-Garcia R, Feofiloff ET. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homo-enxertos ósseos: protocolo do banco de ossos da Escola Paulista de Medicina. [capturado 2007 maio 27] [17 p.] Disponível em: <http://www.unifesp.br/dorto-onco/banco.htm>

- 55.Rust PA, Kolsi P, Briggs TW, Cannon SR, Blunn GW. Will mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts on allografts? *Clin Orthop Relat Res.*2007;457:220-6.
- 56.Mozella AP, Araújo Neto CAS, Fernandes MBC, Regado ER. Análise epidemiológica da obtenção, processamento e utilização de enxertos homólogos pelo banco de tecidos. *Rev INTO.* 2005;3(1):1-40.
- 57.Baptista AD, Sorriha A, Tormes TAM, Abdoune YA, Croci AT, Camargo OP, et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. *Acta Ortop Bras.* 2003;11(4):220-4.
- 58.Rocha LRS, Rocha FA, Moraes JR. Homoenxerto ósseo congelado: relatos de casos clínicos. *ImplantNews.* 2006;3(6):579-84.
- 59.Rondinelli PC, Cabral FP, Freitas EH, Penedo JL, Leite JER, Silveira SLC. Rotina do banco de ossos do Hospital de Traumatologia-Ortopedia (HTO-RJ). *Rev Bras Ortop.* 1994;29(6):385-8.
- 60.Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(5):453-60.
- 61.Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol.* 1994;158(3):555-72.
- 62.Derkx P, Nigg AL, Bosman FT, Birkenhäger-Frenkel DH, Houtsmuller AB, Pols HA, et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone.* 1998;22(4):367-73.
- 63.Meyer U, Meyer T, Vosshans J, Joos U. Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg.* 1999;27(4):222-7.
- 64.Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL, Leslie KO, Mann KG, Taatjes DJ, et al. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):464-73.
- 65.Fanburg-Smith JC, Bratthauer GL, Miettinen M. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskeletal osteosarcoma: a study of 28 cases. *Hum Pathol.* 1999;30(1):32-8.
- 66.Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop.* 1998;22(6):410-6.
- 67.Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl.* 1990;13:149-56.

**ANEXOS**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**DOUTORADO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL**

---

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009

Ao  
Comitê de Ética em Pesquisa e  
Comissão Científica da Faculdade  
De Medicina e HSL – PUCRS

Prezados Senhores:

Eu, \_\_\_\_\_, Chefe do serviço de \_\_\_\_\_ HSL-PUCRS, conheço o protocolo de Pesquisa “ESTUDO *IN VITRO* SOBRE OSTEOINDUÇÃO E OSTEOCONDUÇÃO, UTILIZANDO CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA ASSOCIADAS A UM ARCABOUÇO DE OSSO ALÓGENO, desenvolvido pelo Doutorando em CTBMF \_\_\_\_\_ bem como os objetivos e a metodologia de pesquisa que será desenvolvida e autorizo a participação dos pacientes desse Serviço no Protocolo.

Atenciosamente,

\_\_\_\_\_  
Chefe do Serviço

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL**

**--Termo de Consentimento--**

**Destino das células tronco coletadas junto ao paciente**

---

**Tendo em vista o protocolo de pesquisa proposto, o destino das células tronco coletadas junto ao paciente será o Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que ora coordeno, para pesquisa denominada “ESTUDO *IN VITRO* SOBRE OSTEOINDUÇÃO E OSTEOCONDUÇÃO, UTILIZANDO CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA ASSOCIADAS A UM ARCABOUÇO DE OSSO ALÓGENO. Cabe ainda salientar que, considerando que o DNA e o RNA das células serão extraídos, as mesmas serão destruídas pela lise para liberar os ácidos nucléicos. Assim nada restará das células após a cultura e portanto, de forma alguma, essas células serão utilizadas no próprio paciente ou em qualquer outro paciente, sendo seu uso restrito para essa pesquisa.**

Porto Alegre, setembro de 2009.

**Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado**  
Coordenadora do Laboratório de Pneumologia  
do Instituto de Pesquisas Biomédicas

---