

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE PRÓTESE DENTÁRIA

DANIEL GONÇALVES BOECKEL

**A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOGÊNICAS E ÁCIDO
HIALURÔNICO COMO COMPOSTO CELULAR PARA ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA:
ESTUDO *IN VIVO***

Porto Alegre
2016

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

DANIEL GONÇALVES BOECKEL

**A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOGÊNICAS E
ÁCIDO HIALURÔNICO COMO COMPOSTO CELULAR PARA ENGENHARIA
TECIDUAL ÓSSEA: ESTUDO *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Sesterheim

PORTO ALEGRE

2016

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B669a Boeckel, Daniel Gonçalves
Ácido hialurônico como composto celular para engenharia tecidual
óssea: estudo in vivo / Daniel Gonçalves Boeckel. — Porto Alegre, 2016.
133 f. : il.
Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pós-Graduação em
Odontologia, Área de concentração em Prótese Dentária, PUCRS,
2016.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira
Co-orientador: Profa. Dra. Patrícia Sesterheim.

1. Engenharia Tecidual. 2. Regeneração Óssea. 3. Implantodontia.
4. Células-tronco mesenquimais adiposas. 5. Matrizes. 6. Ácido
Hialurônico. I. Teixeira, Eduardo Rolim. II. Sesterheim, Patrícia. III.
Título.

CDD: 617.69

Alessandra Pinto Fagundes
Bibliotecária
CRB10/1244

RESUMO

A presente pesquisa tem por objetivo caracterizar as células-tronco mesenquimais de origem adiposa (CTMAs) e avaliar seu uso sobre a matriz de ácido hialurônico (AH) como composto celular para engenharia tecidual óssea. Primeiramente, foi realizada a caracterização celular através da coleta do tecido adiposo epididimal, isolamento, cultivo e expansão *in vitro*. Através da análise morfológica da cultura das CTMAs foi possível confirmar característica fusiforme alongada, núcleo centralizado, prolongamentos e adesão à garrafa plástica. A análise de expansão também comprovou um alto índice proliferativo celular, durante os 26 dias de cultura *in vitro*. Já o teste de citometria de fluxo permitiu a identificação dos principais marcadores de superfície que caracterizam as células-tronco mesenquimais (CD29 e CD90) e sendo negativo para marcadores hematopoiéticos (CD31 e CD45). As CTMAs também quando induzidas aos meios adipogênico e osteogênico mostraram plasticidade, já que foram capazes de diferenciarem-se em adipócitos e osteoblastos, respectivamente. Ainda *in vitro*, foi realizado o teste de viabilidade celular através do MTT (atividade mitocondrial), após o contato das CTMAs sobre a matriz de AH. As concentrações de 100%, 75%, 50%, 25% e 15% foram avaliadas sobre a matriz de AH nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados comprovaram uma viabilidade celular acima de 60% em quase todos os tempos e concentrações. Em seguida, foram realizados 50 defeitos ósseos críticos (DOC) na região femoral com 2 mm de diâmetro (um defeito por fêmur) em 25 ratos Lewis. Os tratamentos de enxertia realizados foram divididos da seguinte forma: I-controle negativo / apenas o defeito (C); II- matriz AH; III- CTMAs; IV-CTMAs + AH e V- CTMAs osteoinduzida + AH. Após 23 dias os ratos sofreram eutanásia e tiveram 5 fêmures utilizados para as análises microtomográficas (μ -CT) e histomorfométrica e 5 fêmures utilizados para a análise por RT-PCR (Reação em cadeia da Polimerase em tempo Real). Os resultados para os testes por μ -CT no parâmetro volume de tecido ósseo (VTO) e porcentagem de tecido ósseo (PTO) não apresentaram diferenças estatísticas entre todos os grupos. Já, nos parâmetros superfície de contato (SCO) e densidade de superfície óssea (DSO) tivemos o grupo IV, III e V com maiores índices e diferindo estatisticamente dos grupos controle negativo I e do grupo II. Na histomorfometria também tivemos os grupos IV, V e III com maiores áreas de tecido ósseo regenerado e diferindo com significância dos grupos I e II. Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância de uma via (ANOVA) o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). Em relação ao RT-PCR, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas quando foi avaliada osteonectina (ON), sendo que o grupo II e V apresentaram maior expressão em relação

aos grupos III e IV. Em relação à osteopontina (OP) e ao colágeno Tipo I (Col1A) não foram identificadas diferenças entre os grupos tratados. Os resultados foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

Palavras-Chave: Engenharia Tecidual. Regeneração Óssea. Implantodontia. Células-tronco mesenquimais adiposas. Matrizes. Ácido Hialurônico.

ABSTRACT

The present research aims to characterize the mesenchymal stem cells of adipose origin (MSCAs) and to evaluate its use on the scaffold of hyaluronic acid (HA) as a cellular compound for bone tissue engineering. Firstly, cell characterization was performed through the collection of epididymal adipose tissue, isolation, culture and *in vitro* expansion. Through the morphological analysis of MSCAs culture it was possible to confirm elongated fusiform characteristic, centralized nucleus, extensions and adhesion to the plastic bottle. Expansion analysis also demonstrated a high cell proliferative index during the 26 days of *in vitro* culture. The Flow Cytometry test allowed the identification of the main surface markers that characterize the mesenchymal stem cells (CD29 and CD90) and negative for hematopoietic markers (CD31 and CD45). Moreover, MSCAs when induced to adipogenic and osteogenic media showed plasticity, since they were able to differentiate into adipocytes and osteoblasts respectively. The cell viability test was also performed *in vitro*, through the M.T.T (mitochondrial activity) of MSCAs on the HA scaffold. Concentrations of 100%, 75%, 50%, 25% and 15% were evaluated on the HA scaffold at times of 24, 48 and 72 hours. The results have shown cellular viability above 60% in almost all times and concentrations. Then, 50 critical bone defects were performed in the femoral region with 2 mm in diameter (one defect per femur) in 25 Lewis rats. The grafting treatments were divided as follows: I-negative control / only the defect (C); II-HA Scaffold; III- MSCAs; IV- MSCAs + HA and V- MSCAs previously osteoinduced + HA. After 23 days the rats were euthanized and had 5 femurs used for the microtomographic (μ -CT) and histomorphometric analysis and 5 femurs used for the RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) analysis. The results for the μ -CT tests in the volume of osseous tissue parameter (VOT) and the percentage of osseous tissue (POT) did not present statistical differences among all groups. However, on the osseous contact surface (SCO) and osseous surface density (DSO) parameters, we had groups IV, III and V with higher indexes and differing statistically from the negative control groups I and group II. In histomorphometry we also had groups IV, V and III with greater area of regenerated bone tissue and differing with significance from groups I and II. The results were analyzed statistically by Analysis of Variance one way (ANOVA) and the level of significance was 5% ($p < 0.05$). Regarding RT-PCR, a statistically significant difference was observed only when we evaluated osteonectin (ON) in which group II and V were more expressive in relation to groups III and IV. Regarding osteopontin (OP) and Type I collagen (CollA), no differences were identified among the treated

groups. The results were analyzed using Kruskal-Wallis non-parametric test and the significance level set was 5% ($p < 0.05$).

Key words: Tissue Engineering. Bone Regeneration. Implantodontics. Adipose mesenchymal stem cells. Scaffolds. Hyaluronic acid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ENXERTOS ÓSSEOS	14
1.2 ENGENHARIA TECIDUAL	15
1.3 O ESTADO DA ARTE DAS MATRIZES EM ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.	19
1.4 O ÁCIDO HIALURÔNICO (AH) COMO MATRIZ	24
1.5 A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOSAS (CTMAs) EM ENGENHARIA TECIDUAL	30
<i>1.5.1 Potencial de Diferenciação das CTMAs In Vitro</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2 Potencial de Diferenciação das CTMAs In Vivo</i>	<i>32</i>
1.6 EFEITO PARÁCRINO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)	34
1.7 MODELO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO (DOC)	38
1.8 ANÁLISES E EXAMES REALIZADOS NO PRESENTE ESTUDO	41
<i>1.8.1 Exame de microtomografia computadorizada (micro-CT)</i>	<i>41</i>
<i>1.8.2 Histomorfometria</i>	<i>46</i>
<i>1.8.3 A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	<i>47</i>
2 CAPÍTULO I	49
3 CAPÍTULO II	66
4 DISCUSSÃO	103
5 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICES	127
APÊNDICE A – Tabelas dos Resultados	127
APÊNDICE B – Imagens dos Procedimentos Cirúrgicos	132
ANEXO - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - PUC/RS	133

1 INTRODUÇÃO

Um plano de tratamento reabilitador com o objetivo de oferecer tratamento odontológico completo, nos casos de dentes ausentes ou com prognóstico desfavorável, deve considerar, atualmente, a opção com implantes dentários. Desde que os primeiros relatos sobre osseointegração foram publicados (BRANEMARK *et al.*, 1969; BRANEMARK, ZARB & ALBREKTSSON, 1985), diversos estudos clínicos apresentaram evidências científicas de que os implantes podem servir como ancoragem segura, a longo prazo, para próteses dentárias fixas ou removíveis em pacientes parcial ou totalmente edêntulos. Além disso, é consenso de que o grau de satisfação dos pacientes reabilitados com implantes é elevado (LINDH *et al.*, 1998).

Nesta direção, a utilização de implantes osteointegrados em reabilitações orais vem se constituindo em uma das técnicas mais utilizadas na odontologia para reposição de dentes perdidos, porém nos casos de insuficiência de quantidade óssea para implantação faz-se necessário, muitas vezes, um aumento volumétrico deste tecido para a correta instalação de implantes (PARK *et al.*, 2009; PIERI *et al.*, 2009).

Os tecidos mucosos e calcificados envolvidos nesta reparação com implantes precisam apresentar volume e qualidade ideais, com o intuito de potencializar as funções estética, fonética e mastigatória. Portanto, vários métodos disponíveis, atualmente, de aumento dimensional do osso receptor devem ser considerados como importantes para a melhoria dos índices de sucesso clínico obtidos nas terapias implanto-suportadas (MISCH, 2000).

1.1 ENXERTOS ÓSSEOS

Com o objetivo de suprir a falta de volume ósseo em determinados casos, a odontologia vem aperfeiçoando o desenvolvimento de materiais e técnicas operatórias para enxertia óssea dos maxilares. Essas técnicas são amplamente aplicadas no campo da cirurgia bucomaxilofacial, visando à recuperação de defeitos e/ou sequelas nos tecidos calcificados decorrentes de diversas causas. Mais de 500.000 enxertos ósseos são realizados anualmente no campo odontológico, neurológico e ortopédico nos Estados Unidos (GIANNOUDIS, DINOPOULOS & TSIRIDIS, 2005). Dentre as técnicas de enxertia aplicadas encontram-se opções como levantamento do assoalho do seio maxilar e procedimentos para implantes imediatos com enxertos que utilizam biomateriais de origem autógena, alógena, xenógena e os materiais sintéticos (KAO & SCOTT, 2007).

Os enxertos alógenos, comumente utilizados, são retirados de indivíduos da mesma espécie do hospedeiro, porém com diferente genótipo. O material alógeno retirado para enxertia sofre diferentes processos para sua utilização clínica, entre eles, o debridamento físico, a lavagem ultrassônica, o tratamento com óxido etileno, a lavagem com antibióticos e a irradiação gama visando à eliminação de esporos. Porém, devido aos processos de preparo do enxerto alógeno, muitas das propriedades biológicas, ditas osteocondutoras e osteoindutivas do material, são perdidas e/ou, significativamente, reduzidas, influenciando negativamente sua resposta clínica (GIANNOUDIS, DINOPOULOS & TSIRIDIS, 2005). Já, os enxertos xenógenos possuem origem genética diferente do hospedeiro, sendo os de origem bovina os mais utilizados na clínica odontológica (KAO & SCOTT, 2007). Outro material xenógeno comumente utilizado é a hidroxiapatita coralina ou natural, com aplicação principalmente em defeitos periodontais (ELSINGER & LEAL, 1996). Ainda, encontram-se disponíveis para utilização em técnicas de enxertia óssea os materiais sintéticos, tais como os biocerâmicos (KAO & SCOTT, 2007).

Diversos estudos reportados na literatura apontam para os enxertos de origem autógena como os de melhor resposta clínica quanto à quantidade de tecido neoformado, visto que possuem propriedades como osteogênese, osteoindução e osteointegração. A presença de células osteoprogenitoras nos enxertos autógenos proporciona a formação de tecido ósseo novo, uma vez que a presença de elementos medulares facilita a fusão com proteínas osteoindutivas, células com potencial osteogênico e suporte sanguíneo local (GIANNOUDIS, DINOPOULOS & TSIRIDIS, 2005). Entretanto, apesar da boa resposta clínica, estes apresentam limitações em seu emprego clínico devido a fatores como morbidade do sítio doador e quantidade de material disponível (ITO *et al.*, 2006; YAMADA, *et al.* 2004a). Além disso, a questão da morbidade associada aos enxertos autógenos torna-se relevante, visto que 8% a 20% destes estão associados a complicações pós-operatórias que incluem hematomas, perda sanguínea, injúria de nervos e vasos, formação de hérnias, infecções, fraturas e também, algumas vezes, dor crônica no local doador (ROSS, TACCONI & MILES, 2000).

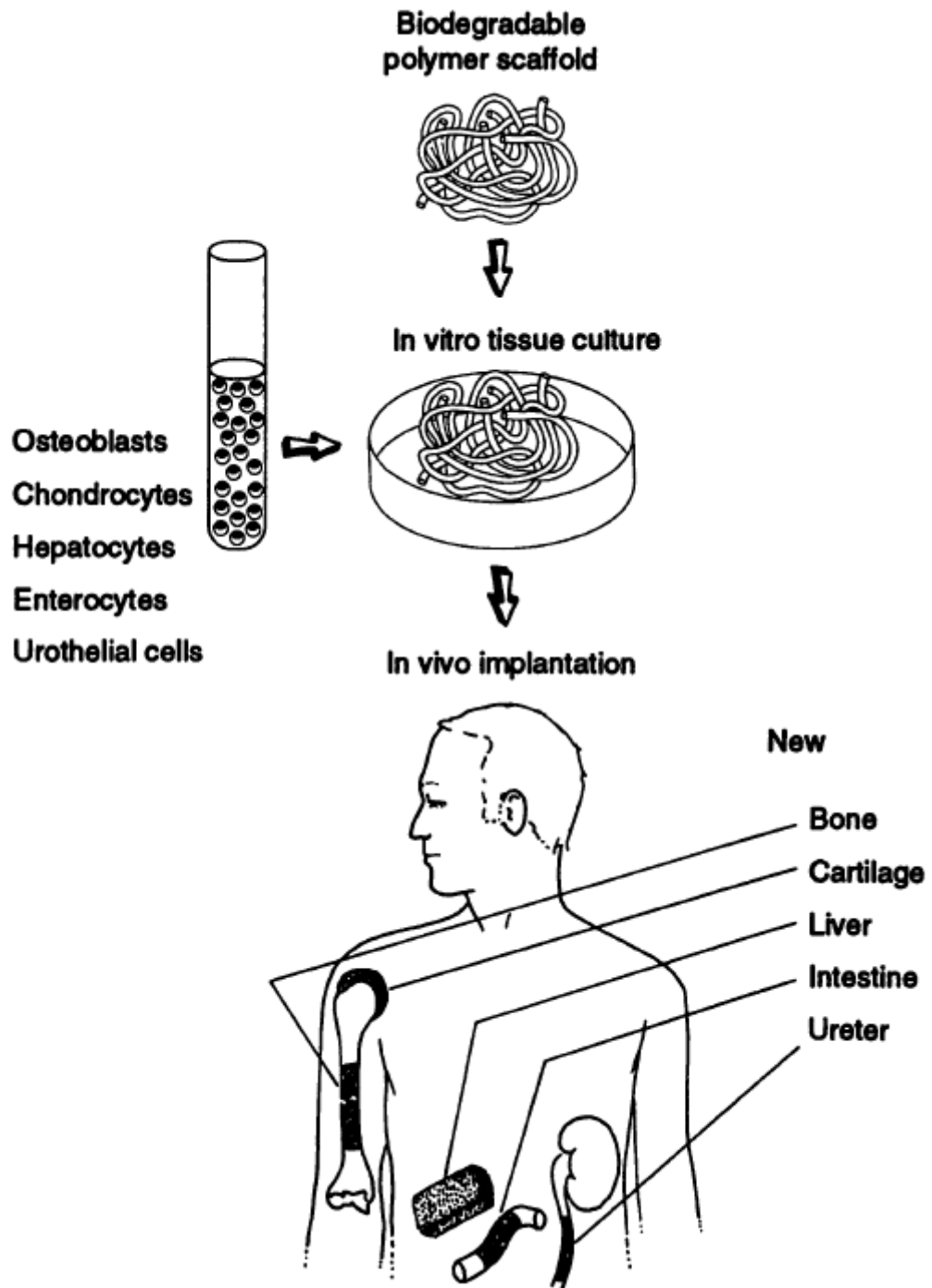
1.2 ENGENHARIA TECIDUAL

A medicina regenerativa causa, atualmente, um impacto considerável na cirurgia craniomaxilofacial. A região craniofacial possui variadas funções como: proteção do cérebro e olhos, respiratória, mastigação, fonação, audição, aceitação social e autoestima (COSTELLO, KUMPTA & SFEIR, 2010).

Moléculas sinalizadoras e proteínas estão sendo empregadas para criação de tecido ósseo, juntamente com técnicas na utilização de células. Descobertas de novos materiais que trazem um aprimoramento nas matrizes, de forma segura e eficiente, poderão garantir a liberação dos fatores de crescimento em locais de interesse, bem como de gens específicos, gerando assim uma melhora nas propriedades mecânicas e na biocompatibilidade do tecido regenerado. Muitos estudos, neste sentido, têm sido realizados em modelos animais com boas respostas. Assim, cirurgiões que trabalham na região craniomaxilofacial devem procurar entender estes novos conceitos regenerativos (COSTELLO, KUMPTA & SFEIR, 2010, 2015).

Há mais de duas décadas, Langer e Vacanti (1993) descreveram e conceituaram o processo da engenharia tecidual, com a utilização de células, moléculas sinalizadoras e matrizes para o crescimento de um novo tecido reparador, uma vez que milhões de americanos já enfrentavam o impacto da perda de tecidos e a condenação de órgãos vitais para vidas humanas, como por exemplo, fígado, pâncreas e intestino. Naquela época, a engenharia tecidual ficou definida como: “campo multidisciplinar do conhecimento, que aplica os princípios da engenharia e da ciência da vida, com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem a função tecidual”. (Figura 1) (LANGER & VACANTI, 1993). Desta data até os dias atuais, a engenharia tecidual tornou-se uma próspera área da ciência, com o estabelecimento, em 2011, de mais de 100 indústrias envolvidas diretamente neste ramo, que já empregavam diretamente, 14.000 pessoas e geravam aproximadamente 4 bilhões de dólares em vendas anuais (JAKLENEC *et al.*, 2012).

Figura 1 - Etapas da bioengenharia tecidual



Fonte: Langer e Vacanti (1993).

Injúrias e perdas de tecidos ósseos e cartilagosos ocorrem devido a diversas razões, entre elas, as degenerações e processos traumáticos que comprometem a qualidade de vida. Os enxertos autógenos podem ser considerados como o padrão-ouro para a regeneração destes tecidos perdidos, porém possuem uma limitação de quantidade de tecido doador disponível e comumente sua obtenção é associada a um grau significativo de morbidade. Ainda, outras opções do tipo enxertos alógenos e xenógenos têm também seu uso com limitações devido ao maior risco de transmissão de patógenos, maior risco de reação imunogênica e o maior risco de infecção cruzada (LEE & SHIN, 2007).

Como opção alternativa aos enxertos autógenos convencionais, nas últimas décadas, técnicas envolvendo engenharia tecidual utilizando a manipulação celular *ex vivo*, conjugadas ou não ao emprego de fatores de crescimento, têm sido reportadas na literatura (BOECKEL *et al.*, 2012; YAMADA, *et al.*, 2004b). O possível impacto da engenharia tecidual como terapia aplicável na clínica odontológica apresenta-se com grande potencialidade, podendo ser aplicada como terapia reparadora de diversos tecidos da cavidade oral, como o tecido ósseo, a cartilagem, a pele, a mucosa oral, a dentina, a polpa dental e as glândulas salivares (KAIGLER & MOONEY, 2001).

A estratégia comumente utilizada em engenharia tecidual exige a biópsia de tecido vivo contendo células de interesse ao sítio receptor. A partir desta coleta, desenvolvem-se culturas celulares em laboratório, que são expandidas e semeadas em matrizes poliméricas para posteriormente serem reinseridas no organismo (KAIGLER & MOONEY, 2001). A tríade que compõe a engenharia de tecido com objetivo reparador é composta por: matriz (géis, fibras, membranas), células progenitoras (células-tronco indiferenciadas ou com diferenciação induzida) e/ou fatores de crescimento indutores (BELL, 2000; STERN *et al.*, 1999).

Reportado na literatura como possível alternativa às técnicas de enxertia óssea, uma alternativa denominada “osso injetável” foi descrita como terapia aplicável na regeneração óssea dos defeitos cranio-faciais. A presente técnica desenvolve-se a partir da aspiração de medula óssea com o intuito de obter células-tronco mesenquimais (CTMs), as quais são, posteriormente, expandidas *ex vivo* e diferenciadas em células de fenótipo osteoblástico. Adicionando-se a este conteúdo celular plasma sanguíneo rico em plaquetas e material biocerâmico tem-se, posteriormente, a formação de um composto celular em estado de gel (HIBI *et al.*, 2006; UEDA *et al.*, 2005; YAMADA, *et al.*, 2004b).

Nos estudos para desenvolvimento e aplicação do osso injetável, verificou-se a promoção de maior osteogênese no composto de CTMs expandidas *in vitro* associadas ao

plasma rico em plaquetas (PRP), quando comparadas ao grupo controle com apenas PRP e ao grupo de osso medular particulado autógeno (YAMADA, *et al.*, 2004b).

Em outro estudo, *in vivo*, foi constatado que o complexo CTMs de coelhos associado ao PRP proporcionou maior aumento de volume ósseo na quarta e oitava semana quando comparados ao complexo de osso cortical e medular particulado também associado ao PRP (OHYA *et al.*, 2005). Além disso, na pesquisa de Ito *et al.* (2005), que analisou propriedades mecânicas e histológicas da engenharia tecidual do osso injetável, o grupo de PRP associado às CTMs apresentou melhor índice no teste de dureza Vickers (ITO *et al.*, 2005). Em humanos, também foi justificada a utilização do osso injetável com índice de sucesso de 100% dos implantes inseridos no osso neoformado em 14 pacientes, e ainda diminuindo o tempo de osseointegração destes implantes e aumentando volumetricamente a indução da formação óssea (UEDA *et al.*, 2008).

Tendo em vista que a técnica do osso injetável constitui-se, basicamente, por material autógeno em quantidades limitadas visando à diminuição da morbidade inerente às técnicas de captação de tecido vivo, suas aplicações em defeitos ósseos ou sequelas crânio-faciais de proporções maiores poderiam estar comprometidas. Esta necessidade de aumento da quantidade dos componentes formadores do osso injetável, com intuito de aumentar o volume da enxertia, exige maior invasividade cirúrgica na captação de sangue e medula óssea, aumentando, assim, a morbidade inerente à aplicação da técnica.

1.3 O ESTADO DA ARTE DAS MATRIZES EM ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

As matrizes ósseas aplicadas na engenharia tecidual dividem-se em dois principais grupos: as de origem natural e as sintéticas, conforme revisão sistemática de literatura de Crowley *et al.* (2013). Essa revisão analisou publicações do ano de 1970 até 2013 com o objetivo de verificar o desempenho das matrizes em bioengenharia óssea em estudos pré-clínicos (animais) e estudos clínicos. Após a análise de 503 artigos publicados nas principais bases de dados, apenas 25 foram aceitas, de acordo com os critérios de inclusão. Desses 25 trabalhos, o autor dividiu-os em 3 grandes grupos: 1) a utilização de matrizes biológicas em animais com 8 publicações; 2) a utilização de matrizes sintéticas em animais com 12 publicações; 3) por último, apenas, 5 trabalhos com ensaios clínicos. Concluiu-se que a utilização de matrizes biológicas ou sintéticas com CTMs são promissoras em modelos animais, porém esta técnica de bioengenharia óssea, ainda possui escassez de ensaios clínicos randomizados que comprovem o sucesso de sua aplicabilidade (CROWLEY *et al.*, 2013).

Os materiais encontrados na natureza possuem propriedades biológicas avançadas, no entanto, são mais difíceis de serem modificados fisicamente e quimicamente. Ademais, sua fonte na natureza não é abundante e é de difícil armazenamento para posterior aplicação em bioengenharia. Estes materiais naturais também devem passar por um processamento com o intuito de eliminar agentes patógenos e, muitas vezes, igualmente, podem causar reações imunológicas no organismo receptor. A grande vantagem dos materiais naturais está em sua facilidade de degradação e eliminação vias mecanismos fisiológicos, fator facilitador para o desenvolvimento, reparo do novo tecido neoformado e integração. Os possíveis materiais naturais utilizados são: colágeno, fibrina, elastina, ácido hialurônico, alginato marinho, quitosan e seda (MONZACK *et al.*, 2011).

Cada tecido do organismo necessita de uma matriz específica e única para facilitar o reparo ou a regeneração. As propriedades da matriz como: sua fonte na natureza, estrutura, mecanismos de degradação e interação com as células podem informar a melhor escolha para sua aplicação na engenharia tecidual. O manufaturamento e a coleta do biomaterial são passos críticos para a aplicação na bioengenharia tecidual. O tamanho das porosidades, a dilatação, a taxa de degradação, as propriedades mecânicas, o mecanismo de fabricação e a bioatividade das matrizes devem ser adaptados para obtenção de uma correta aplicação clínica. Raramente, um material na sua forma mais nativa possui propriedades intrínsecas necessárias para sua melhor utilização e desempenho na engenharia de tecidos. Portanto, alterações destes materiais requerem modificações químicas e ou físicas (MONZACK *et al.*, 2011).

Para a bioengenharia, o estudo do desenvolvimento e do aprimoramento das matrizes ósseas específicas são um dos principais temas de pesquisas na atualidade. Uma matriz ideal não basta manter, induzir e restaurar funções biológicas, mas também ter propriedades de degradação, adesão, captação celular, não provocar reações imunogênicas, possuir força mecânica e flexibilidade. Além disso, deve ter características que facilitem o manuseio manual e ser injetável para ter uma prática de menor invasão cirúrgica possível (BILLSTROM *et al.*, 2013). Hollister e Murphy (2011) introduziram o conceito da matriz óssea ideal, resumida como os 4Fs: forma, função, fixação e formação. Forma é a capacidade da matriz de preencher por completo o defeito ósseo vazio. Função é a capacidade de suportar carga. Já a fixação é a capacidade de promover uma adequada interface e interconexão ao redor do tecido ósseo, evitando desta maneira a falta de união entre a matriz e o tecido receptor. E por último, a formação que é a capacidade da matriz de promover a osteoindução.

Ao mesmo tempo, Wagoner Johnson e Herschle (2011) sugerem cinco características ideais de matriz óssea ideal: (1) Biocompatibilidade que inclui uma adequada degradação, sem

resposta imune, como inflamação e formação de tecido fibroso; (2) Osteocondução, tendo a matriz como responsável pela fixação de células ósseas e guia do crescimento ósseo, ao longo da superfície, permitindo a aderência e a proliferação celular; (3) Bioatividade, habilidade da matriz fazer ligações químicas com o tecido ósseo receptor; (4) Osteoindução, habilidade de induzir a formação óssea; (5) Porosidade interconectada, permitindo que nutrientes e resíduos eliminados possam transitar na matriz, assim como permitir a invasão de tecido neoformado.

A topografia de superfície e o módulo de elasticidade das matrizes são fatores determinantes sobre as células. Matrizes rígidas com módulo de elasticidade entre 25 e 40 Kilopascal (kPa) possuem um efeito indutor osteogênico sobre as CTMs enquanto que as matrizes macias induzem as células a uma diferenciação neurogênica. (ENGLER *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2009). A textura de superfície também está, intimamente, ligada ao comportamento das células mesenquimais quanto a sua diferenciação, superfícies rugosas favorecem também a diferenciação celular osteogênica. Células mesenquimais semeadas em superfície rugosa expressam mais marcadores genéticos como fosfatase alcalina, osteocalcina, Runx2 e TFGβ1. A porosidade também é outro fator muito importante para a diferenciação celular, uma vez que o tamanho dos poros permitirá o seu crescimento e o desenvolvimento, assim como também a liberação do lixo celular (BILLSTROM *et al.*, 2013).

Muitos materiais têm sido empregados como possíveis matrizes na bioengenharia óssea, mas cabe aqui ressaltar que dois grandes materiais têm sido testados com maior número de estudos: o fosfato de cálcio (CaP) e os hidrogéis. O tecido ósseo possui entre 50-70% de fosfato de cálcio na forma cristalina de hidroxiapatita carbonatada em sua composição. Por esse motivo, o fosfato de cálcio tem sido estudado há mais de 90 anos como uma potencial matriz ideal osteocondutora e sendo aplicado na clínica extensivamente no preenchimento de defeitos ósseos. Enquanto que, para a fase inorgânica, os hidrogéis mimetizam de forma mais completa com intuito osteoindutor, uma vez que podem carrear componentes indutores a formação óssea. Os hidrogéis podem ser de origem natural ou sintética como, por exemplo, ácido hialurônico, colágeno, fibrinas, chitosan e alginato de algas marinhas. A limitação dos hidrogéis é sua baixa resistência à compressão que pode, muitas vezes, aprimorar-se com a adição de nanocompositos na sua composição (BILLSTROM *et al.*, 2013). A combinação dos hidrogéis de ácido hialurônico com o fosfato de cálcio tem sido testada como matrizes *in vivo*, em algumas pesquisas com o propósito de mesclar a fase orgânica e inorgânica do tecido ósseo (NGUYEN & LEE, 2014; SUBRAMANIAM *et al.*, 2016). Os resultados obtidos mostram-se positivos e promissores, como, por exemplo, no estudo de Nguyen e Lee (2014) que fizeram a combinação do fosfato de cálcio bifásico e o ácido hialurônico gelatinoso em hidrogel. Nesse estudo,

realizado em coelhos, foi utilizada a matriz composta e semeadas as CTMs com indução osteogênica e os resultados obtidos com microtomografia computadorizada, raios-X, histologia e imunohistoquímica comprovaram resultados positivos desta matriz. Tanto nos resultados *in vitro* como *in vivo*, a combinação dos materiais orgânicos e inorgânicos teve melhor desempenho celular e tecidual quando comparados ao grupo que utilizou somente fosfato de cálcio e ao grupo que apenas utilizou ácido hialurônico. A partir destes resultados um novo modelo de substituto ósseo foi fabricado com a combinação de um material cerâmico e um material polímero, preenchendo os requisitos de interconexão de porosidade e força compressiva para a substituição do osso esponjoso.

Os estudos em regeneração óssea na odontologia não são apenas de interesse da cirurgia bucomaxilofacial e da implantodontia, mas também das doenças periodontais, uma vez que a inflamação periodontal acaba por desorganizar tecidos moles gengivais e induzir reabsorção de tecido ósseo alveolar. Nesta busca, o trabalho de Subramaniam *et al.* (2016) testou a combinação em um mesmo material a presença de hidroxiapatita, sulfato de cálcio, ácido hialurônico e colagenase. Os resultados obtidos no modelo animal de ratos, após a criação do defeito ósseo e, analisado através de imagens micro-CT e histologia, comprovaram uma melhor formação óssea nos grupos com a mescla de matérias rígidos e hidrogéis quando comparados com o grupo que testou apenas grânulos de hidroxiapatita. No presente estudo também fica comprovado que a mistura de materiais inorgânicos e hidrogéis consegue proporcionar facilidade de manuseio para o cirurgião e rigidez estrutural para a reparação do tecido ósseo ocorrer de forma mais rápida e com baixo custo.

As nanopartículas de hidroxiapatita (nano HAP) também têm sido utilizadas em bioengenharia óssea com o objetivo de uma melhor combinação com hidrogéis. Com o intuito de aperfeiçoar a apresentação física dos carreadores nos procedimentos cirúrgicos, as nanopartículas de fosfato de cálcio (nano CaP) juntamente com hidrogéis permitem a possibilidade do desenvolvimento de um material injetável. Hulsart-Billstrom *et al.* (2011) compararam a utilização da hidroxiapatita no formato de nanopartículas e partículas de tamanho convencional juntamente com o hidrogel de ácido hialurônico e proteína óssea morfogênica (BMP). Nos grupos testes e controle tivemos os respectivos grupos: grupo 1-controle, com apenas hidrogel de ácido hialurônico (AH) e BMP-2; grupo 2- AH + BMP-2 + hidroxiapatita (HAP); grupo 3 - AH + BMP-2 +HAP > 100 µm; grupo 4- AH + BMP-2 + nano HAP; grupo 5 - AH + BMP-2 + β-TCP (beta tricálcio fosfato) e grupo 6 - AH + BMP-2 + Ostim 35®. Portanto, foi realizada a variação apenas no tamanho das partículas de hidroxiapatita e os resultados mostram maior densidade óssea no grupo com a aplicação de nano HAP. A partir

destes resultados, as nano CaP variando entre 20 e 80 nanômetros (nm) conferiram resultados de maior proliferação, diferenciação e adesão sobre as CTMs quando comparadas a partículas de tamanho convencional. Além disso, as nanopartículas inibem a formação de osteosarcomas e promovem a síntese de fosfatase alcalina nos osteoblastos (CAI *et al.*, 2007; HULSART-BILLSTROM *et al.*, 2011).

O desenvolvimento e o aprimoramento das matrizes em bioengenharia têm gerado resultados positivos com aplicabilidade clínica, principalmente, em cirurgias da coluna vertebral, fraturas e deformidades de ossos longos, cirurgias bucomaxilofaciais, preenchimento de lesões ósseas causadas por cistos e tumores, cirurgias de quadril e preenchimento de sequelas ósseas causadas por infecções como osteomielites (BILLSTROM *et al.*, 2013).

Porém, novos esforços no desenvolvimento da matriz ideal têm se debruçado em um modelo denominado CAD DESIGN- *computer-assisted designed* (desenho assistido por computador). Através de um programa de computador diferentes materiais, como por exemplo, metais ou cimento fosfato de cálcio podem ser planejados, modificados e manufaturados pela impressão em 3 dimensões (3D), com o objetivo de mimetizar a matriz ideal. Estas construções personalizadas poderão ser empregadas como carreadoras de proteínas, células e outros materiais na regeneração de tecidos. Assim, a utilização do computador para o manufaturamento de matrizes em 3D será a tendência na criação de novos materiais em nano escalas, mesmo que ainda estejamos em um estágio recente dos estudos pré-clínicos (COSTELLO, KUMPTA & SFEIR, 2015; MRAVIC, PEAULT, & JAMES, 2014).

Um dos principais desafios na atualidade na bioengenharia óssea é a barreira existente entre os conceitos e as descobertas laboratoriais nas matrizes e sua aplicabilidade clínica. Portanto, os estudos translacionais de matrizes ósseas acabam sendo um número muito pequeno frente ao número total de pesquisas e gastos financeiros em bioengenharia óssea. Atualmente, percebe-se um distanciamento entre as pesquisas, descobertas de uma matriz óssea ideal e seu funcionamento fisiológico com a indústria criadora e produtora de novos materiais. Assim, o que vemos é uma separação entre o desenvolvimento do desenho computadorizado das matrizes e sua fabricação com êxito *in vivo* (HOLLISTER & MURPHY, 2011).

O principal objetivo da bioengenharia óssea nas áreas da ortopedia e craniomaxilofacial é o desenvolvimento viável clinicamente da reconstrução óssea com os seguintes objetivos: (1) melhorar os resultados clínicos; (2) reduzir casos de morbidade ou complicações como a necessidade de tecido doador; (3) reduzir procedimentos cirúrgicos com ganho de tempo na recuperação do paciente (HOLLISTER & MURPHY, 2011).

Porém, na atualidade, o resultado existente entre o distanciamento das pesquisas acadêmicas e a produção de novos produtos que possam ser comercializados é denominado de: “Vale da Morte” por Hollister (2009). Este fato ocorre ainda devido à escassez de estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em humanos em fase I e II com matrizes ósseas de forma segura e eficaz na sua indicação clínica. Além desta interface existente, os passos e requisitos básicos para a aprovação de um novo produto, que possa ser usado em humanos, demanda um altíssimo custo, longas etapas de estudos e submissões aos órgãos competentes (HOLLISTER & MURPHY, 2011).

Mesmo com grandes avanços na última década, a engenharia tecidual óssea em suas respectivas áreas de estudo, ainda sofre um distanciamento muito grande entre os achados laboratoriais e sua aplicabilidade clínica. No “*workshop*” intitulado: Engenharia Tecidual e Regeneração Óssea: das descobertas à clínica realizado em dezembro de 2010, concluiu-se que são necessários estudos pré-clínicos de maior extensão, incluindo o uso de animais de tamanho maiores e seguido de estudos como ensaios clínicos. Só desta forma, os diferentes componentes da engenharia tecidual como as células, os fatores de crescimento e as matrizes poderão ser aprovados neste processo longo e complexo na produção de materiais (O'KEEFE & MAO, 2011).

1.4 O ÁCIDO HIALURÔNICO (AH) COMO MATRIZ

A matriz de suporte celular é essencial para a engenharia tecidual, porque ela é que fornece o arcabouço necessário para o transporte de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos, além de proporcionar estruturas de adesão. Esse arcabouço deve ser biocompatível, não irritante e resistente. Além destas características básicas, a matriz, quando utilizada na engenharia tecidual, deve facilitar a aderência, a migração, a proliferação e a diferenciação das CTMs (MUSCHLER, NAKAMOTO & GRIFFITH, 2004).

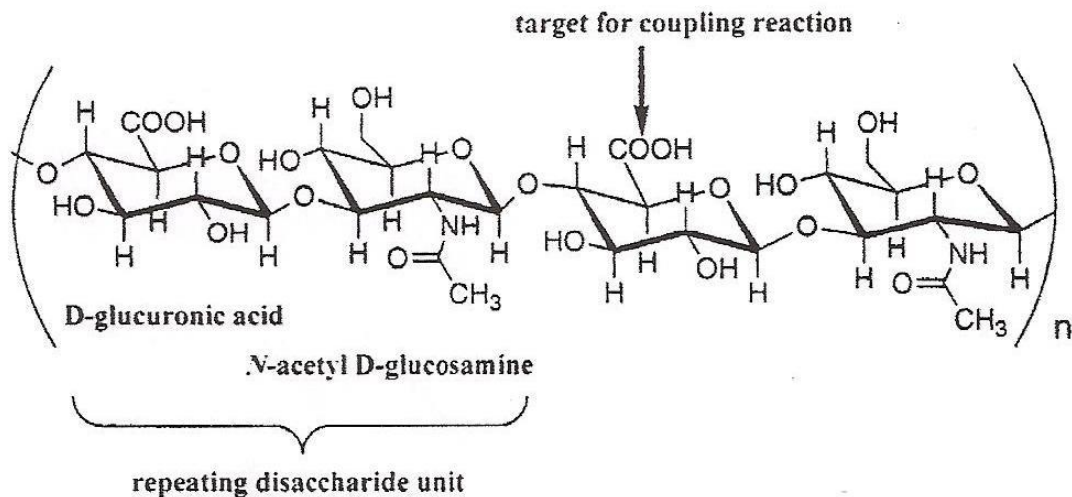
Vários carreadores celulares têm sido testados como veículos capazes de recrutar um número suficiente de células, citocinas e fatores de crescimento no local do tecido a ser reparado ou reconstituído. Nos dias atuais, dispõe-se de matrizes naturais e sintéticas que devem possuir propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de incorporação de moléculas e permitir a colonização celular dentro de sua estrutura. As características físicas, químicas e mecânicas dos carreadores celulares são de fundamental importância para a correta ligação com o tecido que se quer alcançar ou regenerar (SOLCHAGA *et al.*, 1999). A regeneração de tecidos lesados requer a presença, no local da lesão, de células progenitoras com

a habilidade de proliferar e diferenciar em fenótipos apropriados para restaurar o tecido faltante ou danificado. Quando essas células progenitoras estão ausentes, uma ferida reparativa é formada, restabelecendo a continuidade do tecido, mas de estrutura desorganizada e com características funcionais diferentes do tecido original (SOLCHAGA *et al.*, 1999; SPECTOR, 1999).

Recentemente, o ácido hialurônico (AH) tem sido utilizado como um ótimo veículo de CTMs sendo que diversas modificações em sua estrutura podem ser realizadas, quando esse é empregado na engenharia tecidual (BULPITT & AESCHLIMANN, 1999; PRESTWICH *et al.*, 1998).

O AH é formado por uma cadeia de dissacarídeos repetidos contendo ácido glicurônico e n-acetilglicosamina. Possui função essencial na estrutura e na organização da matriz extracelular. Sua capacidade de hidratação permite a abertura de espaços nos tecidos, facilitando um processo de descolamento celular e conseqüentemente permitindo a migração celular (STERN *et al.*, 1999). Sua forma nativa com elevado peso molecular $>2 \times 10^3$ Kilodalton (kDa) é representada pela formulação abaixo (Figura 2), conforme Bulpitt e Aeschlimann (1999).

Figura 2 - Fórmula Molecular do ácido hialurônico (AH) formado pela cadeia de dissacarídeos



Fonte: Bulpitt e Aeschlimann (1999).

Dessa forma, o AH é caracterizado como o principal componente da matriz extracelular e está presente em todos os tecidos conectivos do corpo humano. Nos processos biológicos, envolvendo morfogênese, reparação cicatricial, inflamação e metástases através de receptores celulares, constata-se a presença do HA (KIM *et al.*, 2007). Esse composto também é encontrado em altas concentrações nos tecidos em que ocorrem rápida regeneração e proliferação celular, principalmente, durante a embriogênese e as feridas cicatriciais. As células possuem receptores de superfície específicos para o AH, sendo o CD44 o mais importante (STERN *et al.*, 1999), além de outros receptores de superfície como o RHAMM (receptor de AH de motilidade), o LYVE-1 (endotélio linfático) e o HARE (endocitose) (GENASETTI *et al.*, 2008).

O AH também conhecido por hialuronan possui carga negativa e é formado por polissacarídeo linear pertencente à família das glicosaminoglicanas (GAG). Sua síntese celular ocorre na parede interna da membrana plasmática, ao invés de ocorrer no Complexo de Golgi. Após a sua síntese, o presente ácido é transportado para a matriz extra-celular, sem sofrer modificações, e é caracterizado por um alto peso molecular, podendo chegar a milhões de Daltons (MONZACK *et al.*, 2011).

A interação do AH com a porção interna e externa celular ocorre através das proteínas e proteoglicanas hialaderinas. A principal hialaderina é o receptor CD44 e o receptor RHAMM que regula diversos processos celulares como proliferação e migração (MONZACK *et al.*, 2011).

Nos mamíferos três tipos de enzimas participam da degradação do AH: hialuronidase, β -d-glucuronidase e β -N-actil-hexosaminidase. O comportamento de degradação influencia suas funções biológicas, assim como seu peso molecular também influencia a resposta celular. Os produtos da degradação do ácido que formam 4-20 dissacarídeos possuem propriedades angiogênicas, estimulando o crescimento capilar, proliferação endotelial e formações de tubos sanguíneos. Contrariamente, o AH de alto peso molecular pode inibir o processo angiogênico (ALLISON & GRANDE-ALLEN, 2006).

O AH inibe a adesão das plaquetas e esta propriedade não trombogênica também pode ser desejável nas aplicações de biomateriais (MONZACK *et al.*, 2011).

Na cicatrização de feridas, a presença do AH está relacionada a diminuição de cicatrizes devido sua estrutura poliônica com capacidade anti-oxidantes e limpeza de radicais livres (CHEN & ABATANGELO, 1999).

O presente composto é um ótimo candidato para o desenvolvimento de um biomaterial condutor de células vivas e fatores bioativos devido às suas propriedades físico-químicas (BULPITT & AESCHLIMANN, 1999; LIEBERMAN, DALUISKI, & EINHORN, 2002).

Em um estudo experimental *in vivo*, duas cavidades de 3 mm de diâmetro e profundidade foram criadas na tíbia de ratos para analisar a ação AH. Uma das cavidades foi preenchida com o respectivo ácido e enxerto ósseo autógeno e, a outra apenas com enxerto ósseo autógeno (grupo controle). Na avaliação, após 20, 30 e 40 dias, feita através de cortes histológicos, Aslan, Simsek e Dayi (2006) observaram melhores taxas de crescimento ósseo na presença do ácido.

Em outro estudo experimental, em tecido ósseo femoral de ratos, verificou-se que a composição de alto peso molecular do AH é capaz de acelerar a formação de novo tecido ósseo através da diferenciação das células mesenquimais nas feridas ósseas ou, ainda, pode ser responsável pela manutenção dos fatores de crescimento (TGF- β) no local de cicatrização óssea (SASAKI & WATABABLE, 1995). Entretanto, em outro estudo em animais, utilizando o AH como veículo de fatores de crescimento ósseo (BMP 2), notou-se atraso na osseointegração de implantes de titânio revestidos com hidroxiapatita, mas mostrando benefício no crescimento ósseo com a diminuição de possíveis *gaps* ao redor destes implantes (AEBLI *et al.*, 2005).

No estudo em humanos, comparou-se a utilização do ácido hialurônico DBX® (DENTSPLY Tulsa Denatal Specialties, Oklahoma, EUA) associado a outros materiais como Bio-Oss® (Geistlich Sons Ltd, Wolhusen, Switzerland), beta-tricálcio fosfato (Synthes, Solothum, Switzerland) ou ainda aplicado sozinho na região do seio maxilar. Através da avaliação por meio de cortes histológicos e tomografia computadorizada, concluiu-se que o AH, sozinho ou em combinação, pode ser usado com sucesso em procedimentos para levantamento do seio maxilar devido às suas propriedades osteocondutoras (SCHWARTZ *et al.*, 2007).

Pode-se ainda confirmar os resultados da utilização do AH em terapias periodontais regenerativas, com sua utilização na forma de gel Hyaloss® (Meta, Reggio Emilia, Italia), proporcionando correções ósseas através da mistura entre enxerto autógeno e o gel (BALLINI *et al.*, 2009). Nos tecidos peri-implantares, também se comprovaram benefícios na utilização do AH. No estudo piloto de Araújo Nobre, Cintra e Maló (2007) ao comparar sinais inflamatórios dos tecidos peri-implantares, quando aplicados gel de AH e clorexidina de forma tópica, foram obtidos melhores resultados com o ácido nos meses iniciais. Nesse estudo, ficou comprovada a vantagem da utilização do ácido nos primeiros dois meses de tratamento, após esse período a clorexidina mostrou-se mais eficiente até o 6º mês de acompanhamento.

Diversas modificações podem ocorrer na fórmula do AH, alterando suas propriedades químicas e físicas; mas, na engenharia tecidual, é usado, predominantemente, na forma de hidrogel (PRESTWICH *et al.*, 1998).

As possíveis modificações que podem ocorrer na molécula do AH se dão via uma reação química e ou através de uma ligação cruzada com diferentes moléculas. Através destas modificações é possível alterar seu comportamento e taxa de degradação, mantendo suas propriedades biológicas. Os principais alvos que podem sofrer modificações químicas dentro da molécula do ácido são as ligações do ácido carboxílico, do hidroxil e do acetamido (MONZACK *et al.*, 2011).

Os exemplos nas modificações da molécula do AH são os seguintes: (1) esterificação dos grupos carboxil ou hidroxil com um álcool; (2) uso do composto carbodiimida para modificar grupo carboxílico; (3) Sulfatação do grupo hidroxil e (4) oxidação do grupo hidroxil com periodato de sódio. O mecanismo de degradação do AH pode ser manipulado pelo grau de ligações cruzadas (*crosslinked*), concentração e seu peso molecular (MONZACK *et al.*, 2011).

Alguns estudos *in vivo* já comprovaram a eficiência de hidrogéis de AH, quando utilizados como matrizes de células e fatores de crescimento para regeneração tecidual (KIM *et al.*, 2007). No entanto, diversas pesquisas *in vitro* já analisaram e compararam o comportamento das CTMs na presença do AH para engenharia óssea tecidual (BAIER LEACH *et al.*, 2003; CRISTINO *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2009).

A formação do hidrogel do respectivo ácido também pode ocorrer via fotopolimerização, o que permite um maior controle espacial e temporal sobre o material. Neste método, é possível o encapsulamento celular durante a geleificação (BAIER LEACH *et al.*, 2003). No estudo de Boeckel *et al.* (2014) com objetivos preliminares de uma opção de um agente que proporcionasse aumento volumétrico do osso injetável e visando à melhoria das técnicas de enxertia, testou-se o AH dermatológico (TEOSYAL®, Teoxane, Geneva, Switzerland). Esse material de origem não animal, obtido da fermentação bacteriana não patogênica (cepa de Streptococos) apresentou propriedades de biocompatibilidade e resultados preliminares promissores, quando aplicado na região da face em reconstruções estéticas (FRIEDMAN *et al.*, 2002).

A principal característica de um biomaterial é sua condição não imunogênica e não alérgica, condição esta que o TEOSYAL® disponibiliza, já que sua origem em estado de gel é não animal (LARSEN *et al.*, 1993; MICHEELS, 2001).

As propriedades físicas dos géis de AH dependem do peso molecular, concentração e nível de ligações cruzadas (BALAZS *et al.*, 1991). As ligações cruzadas possíveis de serem

estabelecidas entre as moléculas do TEOSYAL® são responsáveis pela formação de uma malha densa e uniforme (GAMINI *et al.*, 2002). Portanto, o ácido utilizado na presente pesquisa apresenta altos índices de ligações cruzadas, sendo ele o responsável pela formação de um composto com visco-elasticidade excelente (GOA & BENFIELD, 1994)

Além de todas as propriedades apresentadas e descritas anteriormente, o ácido hialurônico TEOSYAL® possui baixa sensibilidade aos radicais livres e, conseqüentemente, diminuição de sua taxa de degradação (YUI; OKANO & SAKURAY, 1992). Mesmo sendo um material absorvível (BERGERET-GALLEY, 2004) e biodegradável transforma-se progressivamente em CO₂ e água quando aplicado na pele humana (GOA & BENFIELD, 1994).

Outra característica muito importante do TEOSYAL® é seu baixo índice de hipersensibilidade e reações inflamatórias adversas como hematomas, nódulos ou pápulas e vermelhidão quando aplicados *in vivo* na região facial (FRIEDMAN *et al.*, 2002).

Frente a todos estes benefícios apresentados anteriormente, Boeckel *et al.* (2014) obtiveram *in vitro* sobre células pré-osteoblásticas (OFCOLL II) nos grupos com a presença do TEOSYAL® uma viabilidade celular de 74 %. O presente AH usado é um material de alto peso molecular (1000 kDa) e os resultados desse estudo comprovaram segurança na sua citotoxicidade e potencial de uso clínico.

Ainda na busca na formulação ideal do AH e sua aplicabilidade em bioengenharia óssea existe a sua apresentação em fibras denominadas de HYAFF, as quais comprovaram o desenvolvimento de condrócitos e suporte em culturas de CTMs (GRIGOLO *et al.*, 2009). Além disso, ficou comprovada a diferenciação celular das CTMs em condrócitos e osteoblastos na presença do composto HYAFF (SOLCHAGA *et al.*, 1999).

A última opção para obtenção da matriz de AH é pela técnica de *electrospinning*, onde pode-se obter uma matriz de nanofibras (LEE *et al.*, 2009). Os resultados em defeitos periodontais em humanos ficaram comprovados por Ballini *et al.* (2009), positivamente com o AH denominado HYALOSS. Nesse estudo nove pacientes tiveram sítios periodontias enxertados com esse ácido e tecidos ósseo autógenos, comprovando resultados positivos através de regeneração óssea e de ligamento periodontal.

O HYALOSS também foi empregado no ensaio clínico randomizado por Briguglio *et al.* (2013). Neste estudo foram incluídos 40 pacientes com defeitos ósseos causados por bolsa periodontal ≥ 7 mm e tratados em dois grandes grupos: controle em que foi realizado apenas debridamento e raspagens radiculares e o grupo tratamento em que foi aplicado o AH. Os resultados comprovaram melhor desempenho nos pacientes tratados com o AH, uma vez que

obtiveram maior ganho clínico em ligamento periodontal e diminuição na profundidade de sondagem quando comparado ao grupo controle.

Assim, frente aos resultados já obtidos com o AH de alto peso molecular, a presente pesquisa utilizou o ácido hialurônico HYALOSS de baixo peso molecular 500 a 730 kDa, o qual sofreu o processo de esterificação. Sua apresentação física é na forma de fibras e em contato com meio líquido torna-se um hidrogel, através das fibras HYAFF.

Vimos nesta formulação do AH a possibilidade de sucesso na bioengenharia óssea, por isso a presente pesquisa utilizou este material como a matriz de CTMs em defeitos ósseos críticos no modelo animal.

1.5 A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADIPOSAS (CTMAs) EM ENGENHARIA TECIDUAL

O crescimento e desenvolvimento da medicina regenerativa dependem de uma fonte de CTMs confiável associada a uma matriz de biomaterial e fatores de crescimento (MIZUMO, 2009).

Gimble (2003) sugeriu que as CTMs para a medicina regenerativa devem preencher os seguintes critérios:

Podem ser encontradas em quantidades abundantes (milhões e bilhões de células);

Podem ser coletadas com procedimentos minimamente invasivos;

Podem ser diferenciadas em múltiplas linhagens em um método regulado e reproduzível;

Podem ser, de modo seguro, transplantadas no hospedeiro tanto de maneira autóloga como alógena;

Podem ser manufaturados em concordância com os Guias Práticos de Excelência em Manufatura (GIMBLE, 2003; GIMBLE, KATZ, & BUNNELL, 2007).

O tecido adiposo pode ser considerado com todos os requisitos mencionados acima. Com o crescimento populacional de pessoas obesas nas populações modernas, o tecido adiposo é abundante e de rápido acesso. A coleta deste tecido é realizada com uma lipoaspiração que é menos invasiva que uma aspiração medular óssea. De maneira geral, um cirurgião plástico com prática pode realizar a lipoaspiração sem desconforto e morbidade do sitio doador (MIZUMO, 2009).

Pequenas quantidades de tecido adiposo (100 a 200 ml) são obtidos com anestesia local e além disso apenas 1 grama rende aproximadamente 5×10^3 CTMs, ou seja, 500 vezes mais

células que em 1 g de aspiração da medula óssea (KITAGAWA *et al.*, 2006). Portanto, tecido adiposo pode ser considerado uma rica fonte de células-tronco.

O isolamento, a proliferação e a caracterização molecular das células obtidas do tecido adiposo possuem protocolos que devem ser seguidos pela maioria dos cientistas (ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. *et al.*, 2001). O tecido lipoaspirado é retirado, cirurgicamente, de origem humana ou animal é lavado extensivamente com uma solução salina tamponada fosfatada com o objetivo de remover células sanguíneas, impurezas e anestésicos locais. A matriz extracelular sofre um processo de digestão com 0.075% de colagenase em uma temperatura de 37°C por 30 minutos para liberar fragmentos celulares. A colagenase só é inativada com a colocação do mesmo volume de DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Logo após a inativação da colagenase, a mistura sofre um processo de centrifugação em força gravitacional que pode variar de 250-350 por um período de 10 minutos para obtenção do *pelet* de células. O *pelet* celular é resuspendido em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimicótico na temperatura de 37°C e 5% de CO₂. O aspecto morfológico das células adipogênicas humanas e animais possui uma aparência fibroblástica e com o potencial de diferenciarem-se na linhagem adipogênica, osteogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica sob culturas em condição apropriadas. Deste modo, este tipo celular caracteriza-se por ser multipotente (ARRIGONI *et al.*, 2009; MIZUNO, 2009).

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H. *et al.* (2001) examinaram o constituinte celular de células-tronco mesodermis obtidas de tecido humano lipoaspirado. Prontamente após a coleta, em que os pacientes eram submetidos à anestesia local, as células foram extraídas e cultivadas. O composto celular denominado lipoaspirado processado através de imunofluorescência mostrou ser de origem mesodermal e mesenquimal com pouca contaminação de outras células. Ao colocar este lipoaspirado processado em cultura celular em diferentes fatores de indução, obtiveram-se, *in vitro*, linhagens celulares adiposas, musculares, condrócitas e ósseas. Portanto, as células de tecido adiposo podem representar uma excelente fonte de células multipotentes como uma alternativa para aquelas células derivada da medula óssea.

Geralmente, as CTMAs duplicam suas quantidades em 2 ou 4 dias quando colocadas em cultura *in vitro*. A extração celular depende de fatores como idade, localização do tecido, tipo do procedimento cirúrgico, condições da cultura, densidade de cultivo e formulações do meio de cultura (IZADPANAHA *et al.*, 2006; MITCHELL *et al.*, 2006). Além disso, a proliferação destas células pode ser impulsionada por diversos suplementos exógenos, como por exemplo, o fator de crescimento plaquetário (KANG *et al.*, 2005).

Assim como todos os tipos celulares cultivados *in vitro*, as CTMAs devem ser utilizadas de modo que não sofram muitas passagens para evitarmos transformações malignas. Rubio *et al.* (2005) comprovaram malignidade celular com o cultivo maior do que 4 meses. Outra grande vantagem das CTMAs é a capacidade de liberação de potentes fatores de crescimento como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IFG-1) (CAO *et al.*, 2005; NAKAGAMI *et al.*, 2005; REHMAN *et al.*, 2004).

1.5.1 Potencial de Diferenciação das CTMAs *In Vitro*

O grande diferencial no uso das CTMAs é sua capacidade de diferenciação em diferentes linhagens celulares. Na literatura atual, existem muitos estudos demonstrando a multipotência das CTMAs *in vitro*. Uma vez que as CTMAs são de origem mesodermal podemos incluir sua diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênicas (OGAWA *et al.*, 2004; ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. *et al.*, 2002; ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. *et al.*, 2001), osteogênica (HALVORSEN *et al.*, 2001), condrogênicas (HUANG *et al.*, 2004), miogênicas (LEE & KEMP, 2006; MIZUMO *et al.*, 2002) e cardiomiogênicas (FRASER *et al.*, 2006). A literatura atual também comprova sua diferenciação não apenas em linhagens celulares de tecido mesodermal, mas também em células de diversas outras origens embriológicas como, por exemplo, neurológicas (GAO *et al.*, 2014) e hepáticas (YIN *et al.*, 2015).

1.5.2 Potencial de Diferenciação das CTMAs *In Vivo*

Além dos ensaios *in vitro* de diferenciação das CTMAs em diversas linhagens celulares, reparo e regeneração de tecidos e órgãos, sua utilização já vem ocorrendo *in vivo*.

As CTMAs quando induzidas em meio adipogênico e semeadas em uma matriz de cola de fibrina possuem a capacidade de se diferenciar em tecido adiposo. Esta diferenciação fica comprovada através da morfologia celular macroscópica, histológica e imunohistoquímica. Mizumo *et al.* (2008) comprovaram que o isolamento de CTMAs proteína verde fluorescente positiva (*gfp- green fluorescent protein*) induzidas à diferenciação adipogênica quando implantadas *in vivo* se diferenciam após 8 semanas em tecido adiposo. Neste estudo, além das análises imunohistoquímicas, o novo tecido formado foi identificado pela *gfp*.

Em modelos de estudo em ratos com isquemia dos membros posteriores, a administração intravenosa ou intramuscular de CTMAs melhorou significativamente o suplemento vascular (CAO *et al.*, 2005; NAKAGAMI *et al.*, 2005; REHMAN *et al.*, 2004). Este mecanismo pode ocorrer pela ação direta das células em se diferenciarem em células endoteliais ou pela ação indireta das células, uma vez que secretam fatores de crescimento angiogênicos. Lu *et al.* (2008) no modelo experimental de camundongos analisaram a revascularização da pele ao injetar CTMAs por via subcutânea e compararam aos três grupos: apenas meio de cultura sem a presença de células, adipócitos maduros e fator de crescimento fibroblástico. Nos resultados histológicos, foi constatado um maior incremento da revascularização e diminuição da isquemia tecidual no grupo em que foi realizada a injeção das CTMAs, em relação aos demais grupos.

A administração tópica de CTMAs em úlceras pode acelerar o processo de cicatrização da pele. Nambu *et al.* (2007), ao utilizarem CTMAs associadas à esponja de colágeno tipo I comprovaram maior densidade capilar e espessura do tecido de granulação quando comparadas ao grupo que utilizou apenas o colágeno. Assim como, as CTMAs podem ser utilizadas na melhora cicatricial de úlceras de pacientes diabéticos, também promoveram maior regeneração tecidual no estudo experimental de camundongos (NAMBU *et al.*, 2009).

Com este mesmo objetivo regenerador e facilitador, as CTMAs vêm sendo testadas em defeitos ósseos com o objetivo de otimização e excelente qualidade no tecido regenerado. Choi *et al.* (2014) isolaram CTMAs humanas e sem indução a diferenciação fizeram a enxertia em feitos ósseos de 6 milímetros (mm) de diâmetro em calvária de ratos. Os mesmos números de células foram utilizadas em todos os defeitos (1×10^6 células), ocorrendo variação apenas no tipo de matriz utilizada, onde tivemos em cada grupo experimental: colágeno, PLGA (ácido glicólico polilático) ou hidroxiapatita sem a presença das células e os mesmos materiais com a presença de células. O grupo com maior quantidade de osteoblastos e osteócitos foi o grupo com a presença celular e a hidroxiapatita. A conclusão deste estudo foi de que a matriz celular mais rígida exerceu sobre as células indiferenciadas a indução osteogênica.

Bohnenblust *et al.* (2009) também utilizaram CTMAs na regeneração em defeitos ósseos de 8 mm de diâmetro na região de calvária de ratos, porém as células neste experimento sofreram previamente *in vitro* o processo de osteoindução antes de serem enxertadas. Os grupos experimentais com tecido ósseo alógeno colonizado pelas células apresentaram maior densidade e qualidade óssea após análises microtomográficas e histológicas. O grupo experimental que utilizou fibrina como matriz carreadora das células CTMAs apresentou menor

desempenho na regeneração óssea, já que neste grupo houve dificuldade de difusão de nutrientes na região central do enxerto.

A maioria dos estudos na atualidade procura nas CTMAs a combinação ideal entre a matriz e as células adiposas para a neoformação óssea. Podemos notar também que alguns estudos já não fazem a indução à diferenciação osteogênica prévia *in vitro* para a realização da enxertia, depositando na matriz utilizada o papel de indução no tecido que queremos regenerar. Além disso, o microambiente onde as células são depositadas também exerce a função desencadeadora no tipo de tecido que as CTMs irão se diferenciar.

1.6 EFEITO PARÁCRINO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de auto renovação, diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional de determinados tecidos (DRAGOO *et al.*, 2003; RATAJCZAK *et al.*, 2014). A ampliação do seu uso exigiu uma padronização dos marcadores moleculares que caracterizam as CTMs, sendo assim a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) propôs três critérios básicos para a caracterização de uma célula-tronco mesenquimal. Desta forma, as CTMs foram consideradas como: (1) plástico aderente em condições de cultura celular; (2) positivas para os marcadores CD105, CD73 e CD90 e negativas para os marcadores CD45, CD34, CD14 e CD11b; e (3) capazes de se diferenciarem em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando expostas *in vitro* a meios de culturas indutores às linhagens correspondentes (DOMINICI *et al.*, 2006).

As CTMs secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que possuem atividade tanto parácrina como autócrina. Acredita-se que essa propriedade seja fundamental para a explicação dos efeitos terapêuticos observados com estas células. Esses fatores secretados pelas CTMs possuem uma ação anti-apoptótica, pró-angiogênica e efeito reparador endógeno (GNECCHI *et al.*, 2008; RATAJCZAK *et al.*, 2014). Outra característica muito importante destas células é atividade imunossupressora, visto que possuem a capacidade de se acumular ao redor de processos inflamatórios e tumorais quando administrado *in vivo*. Sabe-se que as CTMs podem imunomodular tipos celulares tanto do sistema imune inato como do sistema imune adaptativo, exemplo de células dendríticas, células NK, neutrófilos, linfócitos T e B e células T regulatórias. A inibição de células T leva à diminuição da produção de INF- α (interferon- α) tanto *in vitro* como *in vivo* e ao aumento da produção de IL-4 (interleucina), desta

maneira ocorre uma alteração no perfil da resposta imune de pró-inflamatória para anti-inflamatória (NAUTA *et al.*, 2006).

Um efeito parácrino imediato constatado de células-tronco derivadas da medula óssea é a liberação de moléculas citoprotetivas, principalmente em estudos com células cardíacas. A citoproteção é expressa através da super expressão do gene Akt-1 *in vitro* (GNECCHI *et al.*, 2008).

Para constatar que a superexpressão do gene Akt regula a liberação de fatores protetores, foi testado o seu aumento através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) e a identificação das moléculas VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), bFGF (fator de crescimento fibroblástico), HGF (fator de crescimento hepatócito) e IGF-I (fator de crescimento insulínico 1) em situações de normoxia e aumentada em hipóxia (NAGAYA *et al.*, 2005).

Após a injeção de células-tronco em corações afetados por infarto, observou-se o aumento na densidade capilar, diminuição do tamanho do infarto e melhora cardíaca quando comparada a grupos controle sem células (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Outra constatação relevante verificada com as CTMs em estudos cardíacos, por enquanto, é o remodelamento tecidual pós-infarto. Nagaya *et al.* (2005) injetaram CTMs no miocárdio de ratos que apresentaram cardiomiopatia dilatada secundária a miocardite experimental. Ao comparar ao grupo controle, os animais que receberam CTMs apresentaram considerável melhora de densidade capilar e redução da formação de tecido colagenoso no miocárdio, com melhores respostas no funcionamento cardíaco. Fica comprovada que além da citoproteção e da neovascularização, os fatores parácrinos liberados pelas CTMs causam uma alteração benéfica na matriz extracelular.

Frente aos resultados de estudos em animais, comprova-se que as CTMs expressam algumas moléculas envolvidas na biogênese da matriz extracelular, tais como colagenase, metaloproteinase, serina-protease e inibidores da serina-protease, sugerindo que as células transplantadas podem inibir a fibrose por meio de efeitos parácrinos (OHNISHI *et al.*, 2007). Xu *et al.* (2005) avaliaram o efeito do enxerto de CTMs sobre a matriz extracelular em tecido cardíaco de ratos infartados. Neste estudo, os autores comprovaram que as CTMs transplantadas atenuam o aumento da expressão de colágeno Tipo I e III quando comparados ao grupo controle. Os autores concluem que as CTMs exercem um efeito parácrino antifibrótico no tecido cardíaco e um favorecimento no remodelamento tecidual.

O efeito parácrino também pode ser comprovado na regeneração do tecido ósseo. No estudo de Levi *et al.* (2011) foram realizados 4 grupos de tratamento em defeitos ósseos críticos na região da calvária: (1) apenas defeito de 4 mm; (2) defeito e colocação da matriz de PLGA sem células; (3) defeito e células-tronco humanas de tecido adiposo em matriz de PLGA e (4) defeito e células-tronco de ratos de tecido adiposo em matriz de PLGA. Os resultados avaliados através de análise histológica, microscopia eletrônica, imunofluorescência e reação polimerase em cadeia (PCR) comprovaram a interação celular entre as CTMAs injetadas e os osteoblastos do hospedeiro. Portanto, o grupo de melhor resultado na regeneração óssea foi o grupo 3 com CTMAs humanas, sugerindo o benefício do efeito parácrino no reparo ósseo. As CTMs humanas de tecido adiposo quando enxertadas no defeito ósseo crítico interagiram com o ambiente receptor, além disso houve uma interação entre as CTMs adiposas humanas e as células osteoblásticas do rato. Isto foi verificado através do aumento de marcadores ósseo específicos para tecido ósseo nos defeitos com a presença das respectivas células.

Linero e Chaparro (2014) também comprovaram o efeito parácrino das CTMs em defeitos ósseos mandibulares em ratos. Através de exames radiográficos, morfometria e análise histológica, o estudo propôs a investigação da ação do meio contendo os fatores de crescimento ósseo em hipóxia e normoxia extraídos ds CTMs humanas. Os resultados do presente estudo comprovaram através de seus grupos experimentais que o grupo que apresentava as CTMAs de origem humana na matriz de plasma de sangue humano, e o grupo com a presença apenas de meio condicionado, também na matriz de plasma, com presença de citocinas, fatores de crescimento, proteases e receptores solúveis apresentaram uma maior formação óssea do que no grupo apenas com a matriz de plasma. A terapia com o uso de meio condicionado na presença dos fatores de crescimento evita algumas dificuldades e problemas nos transplantes de células. Além disso, o armazenamento e o transporte do meio condicionado não é complexo como seria das células.

Ando *et al.* (2014) comprovaram a ação parácrina das CTMs na distração osteogênica. Através da mensuração de novo tecido no calo ósseo, o presente estudo pode comprovar que o meio condicionado das CTMs humanas acelera a formação óssea em um modelo de rato. Ao compararem o grupo com a presença das CTMs com o grupo apenas com o meio condicionado observou-se um maior calo ósseo no mesmo período no grupo apenas com o meio condicionado. O meio condicionado foi capaz de recrutar as células murinas estromais da medula óssea e células progenitoras do endotélio capazes de inibir a inflamação, apoptose e promoverem a diferenciação osteoblástica, angiogênese e a proliferação celular. A análise imunohistoquímica identificou a presença MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) e IL-

3/6 (interleucinas 3/6) como responsáveis no recrutamento das células murinas estromais, além disso há uma grande variedade de fatores tróficos que aceleraram a cicatrização no processo de distração osteogênica.

A regeneração periodontal através do efeito do meio condicionado de CTMs também foi comprovada no estudo Inukai *et al.* (2013). No ensaio *in vitro* o meio condicionado estimulou a migração e a proliferação das CTMs e das células do ligamento periodontal. Citocinas como IGF, VEGF, TGF β 1 e fator de crescimento hepatócito foram detectados no meio condicionado de CTMs. Já no teste *in vivo*, o defeito ósseo crítico mandibular no modelo animal canino foi preenchido por: meio condicionado de CTMs, apenas meio e vazio. A matriz TERUPLUG® foi utilizada nos defeitos ósseos. Após 4 semanas as análises radiográficas e histológicas comprovaram a maior regeneração óssea e maior aumento do cimento no grupo com apenas o meio condicionado de CTMs.

As células-tronco secretam uma grande quantidade de fatores tróficos e imunomodulatórios. Estas citocinas regulam uma série de eventos osteogênicos, angiogênicos, migração celular, proliferação e diferenciação osteoblástica. Algumas destas citocinas, os presentes autores exemplificam como: IGF-1 (fator de crescimento insulina), TGF- β (fator de crescimento β), VEGF (fator de crescimento endotelial), IL-6 (Interleucina 6), angiogenin, BMP-1 (proteína óssea morfogenética 1) e outros estão envolvidos na regeneração óssea e são secretadas pelas CTMs (INUKAI *et al.*, 2013; OSUGI *et al.*, 2012). Chama atenção que a BMP-1 é um regulador da matriz extracelular, principalmente na regulação e no papel indutor do tecido cartilaginoso e no desenvolvimento ósseo (POLACEK *et al.*, 2011). A BMP-1 atua como uma metaloprotease clivando parte dos pro-colágenos I, II e III, desta maneira transformando em componentes da matriz extracelular funcionais (KESSLER *et al.*, 1996).

O fator de crescimento BMP-2 possui um grande potencial osteogênico e já se encontra pronto para a utilização no mercado, porém requer uma corretíssima dosagem na sua utilização. Além disso, a BMP-2 pode provocar uma severa reação inflamatória como demonstrado no estudo de Perri *et al.* (2007).

O estudo de Osugi *et al.* (2012) foi um dos primeiros experimentos em que foi utilizado o meio condicionado de CTMs como alternativa e alto potencial na indução de tecido ósseo *in vitro* e *in vivo* sem a necessidade de transplante de células. O transplante de células possui uma grande vantagem em relação à resposta imune, uma vez que as células-tronco suprimem a proliferação de células linfocitárias-T, enquanto que apenas o meio condicionado não possui este potencial. Porém, o meio condicionado é capaz de fazer o recrutamento de células mesenquimais no ambiente receptor que serão capazes também de ajudar na supressão das

células T. Neste estudo, também foram utilizadas células-tronco indiferenciadas, ao invés de células com indução osteoblástica, uma vez que o meio condicionado independente de diferenciação possui citocinas responsáveis pela angiogênese, migração celular, proliferação e diferenciação em osteoblastos.

1.7 MODELO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO (DOC)

A criação de defeitos ósseos em modelos animais é um desafio para os estudos de regeneração óssea para diversas áreas da odontologia, principalmente, nas especialidades de cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, prótese e implantodontia.

O reparo do defeito ósseo é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. Esses quando realizados de forma adequada e no correto local anatômico são menos sujeitos a interferências mecânicas e deficiência de suporte sanguíneo quando comparado às fraturas. Este modelo tem sido utilizado em muitos experimentos clássicos que analisam a influência e ações farmacológicas dos biomateriais, sobretudo, com o intuito de melhorar a regeneração óssea (SCHENK, 1994).

Conforme Schmitz e Hollinger (1986), um defeito ósseo experimental deve ter um tamanho suficientemente grande que não ocorra um reparo espontâneo, portanto só nesta situação criada o potencial osteogênico do implante, enxerto e ou medicamento poderá ser considerado real. O defeito intraósseo de tamanho crítico é aquele de menor tamanho que não pode ser reparado espontaneamente durante toda a vida do animal.

No entanto, como a maioria dos estudos possui duração limitada, em pesquisas experimentais deve-se considerar como defeito de tamanho crítico aquele que não sofre reparo no período de duração do estudo (GOSAIN *et al.*, 2000).

Instituiu-se o conceito de defeito ósseo de tamanho crítico para minimizar diferenças relacionadas à idade, espécie e local anatômico em animais experimentais. Deste modo, foi viável a padronização dos defeitos para possibilitar a comparação dos resultados de vários estudos e poder avaliar o potencial osteogênico de forma mais próxima a realidade (SWEENEY *et al.*, 1995).

Diversos experimentos para análise do processo cicatricial ósseo vêm sendo realizado em ratos (ARNOLD & ADAM, 1999), coelhos e cachorro, porém poucos estudos em macacos e humanos são relatados. Freeman e Turnbull (1973) foram os primeiros a estudar defeitos ósseos em calvária de ratos. Em seus experimentos foram utilizados ratos Wistar com 500 miligramas (mg), defeitos críticos de 2 mm de diâmetro foram realizados na região da calvária

e avaliados após 12 semanas. Os resultados comprovaram a presença do defeito durante o período, portanto pode ser considerado um DOC. Frente a diversos estudos, ao longo de muitos anos, e medições com variações de tempo e tamanho de defeitos ósseos em calvária de ratos, Arnold e Adam (1999) concluíram que um defeito crítico pode variar de 2 mm a 2 cm. Além disso, macacos e humanos precisariam de defeitos maior que 2 cm para ser considerado crítico.

Ao considerarmos que a reconstrução óssea é um pré-requisito para reabilitações dos maxilares na odontologia, assim, os modelos experimentais de defeitos ósseos são utilizados para testar possíveis materiais substitutos. Os dados mensuráveis na regeneração do tecido ósseo devem ter reprodutibilidade e condições de comparação de suas amostras. Com este objetivo, Schlegel *et al.* (2006) comprovaram que o defeito crítico mono cortical se apresenta como uma alternativa para o teste de substitutos ósseos. Neste estudo foram avaliados defeitos ósseos de 10 x 10 mm mono corticais em calvárias de mini porcos. Foram testados um grupo controle negativo e um grupo com enxerto autógenos nos períodos de 2, 4, 12, 26, e 52 semanas através de análises por microradiografia e microscopia óptica. Os resultados comprovaram que o defeito deixado vazio ainda possuía 30 % de região sem mineralização óssea. Portanto, defeitos mono corticais preenchem todos os requisitos de um defeito ósseo crítico (XU *et al.*, 2012).

Há a possibilidade também da criação de defeitos ósseos segmentais, através da fratura, separação dos segmentos ósseos e posterior avaliação da cicatrização. Srouji *et al.* (2011) criaram um modelo de DOC através da fratura do fêmur para avaliação da regeneração através da bioengenharia óssea. Neste experimento, foram criados defeitos ósseos segmentais de 2 mm de distância entre os segmentos femurais e fixação externa em camundongos. A região fraturada foi tratada com 4 grupos de enxertia: apenas defeito (controle negativo), apenas matriz de hidroxiapatita-coralina, matriz de hidroxiapatita- coralina mais células da medula óssea humana e por último apenas osso alógeno. Com este modelo de defeito ósseo foi possível a avaliação através de raio x, tomografia micro computadorizada e cortes histológicos a regeneração óssea de todos os grupos durante 4 semanas e 8 semanas.

Chu *et al.* (2007) também criaram o defeito ósseo segmental femoral em ratos com 5 mm de distância entre os segmentos e fixação através de um fio metálico intramedular. Foi possível em 1, 3, 6, 12 e 15 semanas acompanhar a cicatrização óssea do grupo controle e teste através de microtomografia.

Com o objetivo de criar um modelo de defeito ósseo em ratos e avaliar a regeneração através da terapia celular Raposo-Amaral *et al.* (2010) realizaram um estudo preliminar. Com a utilização de ratos Wistar foram criados defeitos alveolares na maxila superior de 28 mm² e

avaliada a cicatrização óssea espontânea no período de 2 semanas e 4 semanas. Os resultados de autorregeneração óssea mostraram uma taxa de formação óssea de 5.73 mm² após 2 semanas e 19 mm² após 4 semanas da criação do defeito. Estes resultados sugerem que o período de 4 semanas será o suficiente para avaliar a capacidade de células-tronco em regenerar osso em ratos Wistar com defeito ósseo alveolar.

Bateman *et al.* (2012) realizaram defeitos ósseos críticos com 8 mm de diâmetro em calvária de ratos para testar o efeito da glicoproteína osteoactivin. Os animais foram eutanasiados após 2 e 4 após o tratamento, portanto o melhor tempo para se ter uma resposta óssea neste tipo de defeito crítico foi no período de 4 semanas, uma vez que o grupo controle não possuía uma regeneração óssea completa e o grupo tratamento com osteoactivin apresentou 70 % dos animais com formação óssea completa. Mesmo assim, o presente autor sugere o estudo em animais de maior porte para poder avaliar o real efeito da glicoproteína osteoactivin e sua possível aplicação futura em indicações periodontais e craniofacial.

Parrilla *et al.* (2011) com o objetivo de avaliar a regeneração óssea através de uso de CTMAs indiferenciadas, utilizaram o modelo de defeito crítico de 5 x 5 mm em mandíbulas de 12 ratos Wistar. Ao compararem o grupo controle negativo com apenas o defeito e a matriz sem colonização celular, grupo com uso de células adiposas e grupo de células de fibroblastos humanos no período de 4, 8, e 12 semanas, conclui-se que o tamanho do defeito e os períodos analisados foram suficientes para comprovar o melhor efeito na regeneração óssea com o uso de células adiposas sem indução osteogênica prévia.

Xu *et al.* (2012) também utilizaram o tamanho de 5 mm como defeito crítico em calvária de ratos Fischer para avaliação do composto formado por células-tronco da medula óssea/fator de crescimento derivado de plaquetas e β tricálcio fosfato. O período de avaliação neste trabalho foi de 8 semanas.

Além dos defeitos criados em calvária de ratos e defeitos segmentais, outras regiões anatômicas podem ser usadas para criação do defeito ósseo em ratos. Ozturk *et al.* (2006) criariam defeitos com 5 mm de diâmetro no osso rádio do antebraço de ratos Wistar para análise de regeneração com o uso de matriz de osso desmineralizado e ou hidroxiapatita tricálcio fosfato. Após dez semanas dos materiais enxertados, os animais foram sacrificados para exame radiográfico e análises histológicas.

Da mesma forma em que propomos a criação do defeito femural de 2 mm em ratos Lewis para avaliação do uso de CTMs associado à matriz de ácido hialurônico durante 23 dias, Keibl *et al.* (2011) realizaram o mesmo defeito e na mesma região anatômica. O objetivo do estudo foi justamente poder avaliar no período de 2 e 4 semanas o efeito do preenchimento do

defeito com CTMs de origem adiposa, associados à matriz de fibrina e BMP-2 (proteína óssea morfogenética- 2). As análises foram realizadas por imagens em micro – CT e cortes histológicos, com resultados indicando maior cicatrização óssea no grupo com aplicação de fibrina, células-tronco adiposas e BMP-2.

Portanto, o modelo de defeito proposto nesta pesquisa seguiu achados importantes com o uso de células adiposas na regeneração do tecido ósseo em períodos de tempo e tamanho do defeito já mencionado em outras pesquisas com a utilização deste modelo animal.

1.8 ANÁLISES E EXAMES REALIZADOS NO PRESENTE ESTUDO

A seguir serão abordados os exames e análises realizados para avaliar a regeneração óssea.

1.8.1 Exame de microtomografia computadorizada (micro-CT)

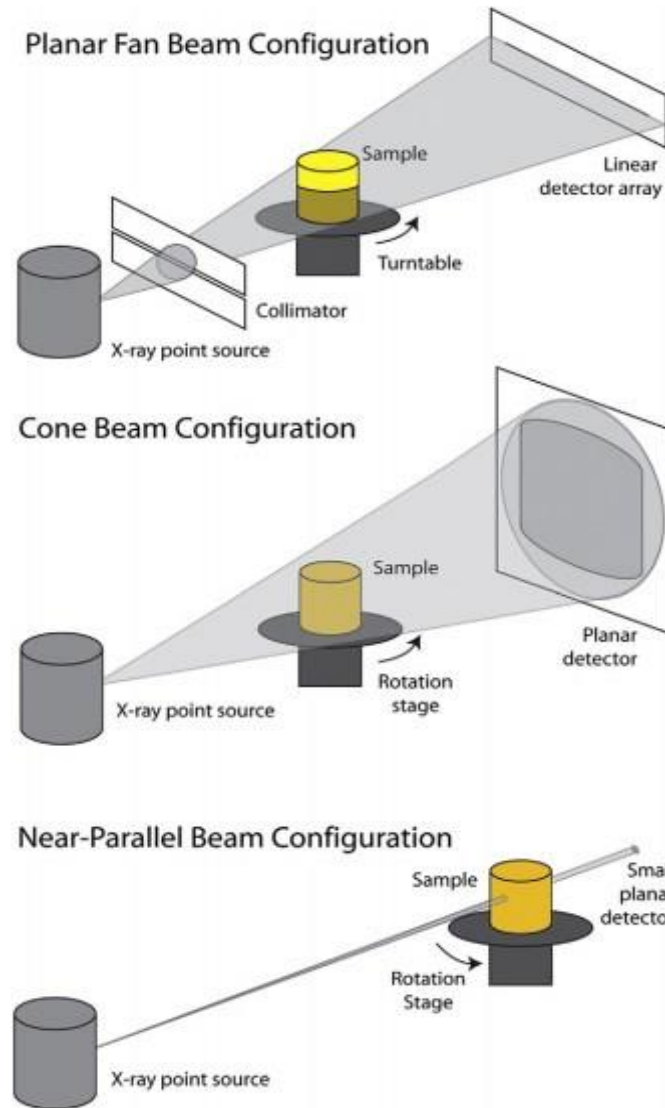
A tomografia computadorizada tem sido amplamente usada no diagnóstico clínico através de imagens desde o início dos anos 70 (HOUNSFIELD, 1973). É uma técnica de imagem morfológica não destrutiva que pode mensurar a estrutura interna de um objeto em 3D. Ela fornece imagens biológicas com resoluções isotrópicas que vão desde alguns milímetros nos aparelhos clínicos de tomografia computadorizada até algumas dezenas de micrômetros nos aparelhos laboratoriais de microtomografia computadorizada (micro-CT) e por último com aparelhos de radiação sincrotrônica com resolução abaixo de 100 nm. (POLAK *et al.*, 2012). Nos dias atuais, existem muitos aprimoramentos na aquisição e análise de imagens micro-CT para o osso trabecular e biomateriais empregados na regeneração óssea (GULDBERG *et al.*, 2004; POLAK *et al.*, 2012).

A unidade da micro-CT produzida, na década de 90, foram secções espaçadas de 127 micrometros (μm) com uma resolução em pixels de 127 μm . Atualmente, as imagens são capturadas com uma resolução inferior a 10 μm (JUNG, LOMMEL, & KLIMEK, 2005). Os aparelhos de micro-CT de mesa fornecem resoluções que variam de 5 a 100 μm . Podem ser aferidas amostras com diâmetros variando de poucos milímetros a, no máximo, 100 mm. Aparelhos micro-CT de mesa proporcionam uma técnica precisa, validada e que tem sido amplamente difundida para projetos de pesquisa envolvendo microarquitetura óssea (ALEXANDER *et al.*, 2001; BOHNER *et al.*, 2005), crescimento ósseo (GULDBERG *et al.*, 2004) e arcabouço estruturais dos biomateriais (JONES *et al.*, 2004).

A micro-CT é um método não invasivo que permite uma avaliação morfológica quantitativa do tecido coletado nas três dimensões (POLAK *et al.*, 2012). Além disso, esta ferramenta permite uma avaliação da cicatrização óssea e da interface do tecido ósseo com o material enxertado, deixando a análise histológica como coadjuvante no processo das análises teciduais (EFEOGLU *et al.*, 2007).

O aparelho de micro-CT é composto por um feixe incidente de raios-X, policromático, que é projetado sobre a amostra, a qual fica fixada a uma plataforma rotacional. Esse feixe de raios-X inicial é atenuado pela massa corporal da amostra e um feixe resultante atravessa a amostra e sensibiliza uma tela sensível do raio-X. Atrás da tela há uma câmera que adquire as imagens em duas dimensões e envia a um computador, o qual processa e analisa montando a imagem através de programas específicos (RITMAN, 2004). A ilustração a seguir exemplifica a formação da imagem. (Figura 3).

Figura 3 - Formação da imagem da Micro-CT de alta resolução, Ilustração esquemática da Universidade do Texas, Austin.



Fonte: Kyle e Ketcham (2015).

As radiografias são fornecidas em duas dimensões para o computador, o qual, através de um programa de reconstituição de imagens, cria um modelo em três dimensões e quantifica os resultados da nova imagem tridimensional. A micro-CT permite, assim, a visualização e medição de estruturas 3D sem a preparação da amostra ou fixação química (RODRIGUES *et al.*, 2009). Possibilita também o diagnóstico e avaliação da localização e tamanho de lesões periradiculares em casos de estudos endodônticos (FAN *et al.*, 2004).

O emprego da micro-CT apresenta inúmeras vantagens, como é possível verificar em diversos estudos de micro arquitetura óssea e análises endodônticas dos últimos anos. Por ser um método não invasivo proporciona maior rapidez na obtenção dos resultados quantitativos

(JUNG, LOMMEL, & KLIMEK, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009). Essa técnica também possibilita facilidade no manuseio do equipamento e do software. As imagens reconstruídas quando utilizadas através de sofisticadas ferramentas do programa, permitem a visualização das imagens seccionadas com sombras e filtros que podem realçar porosidades, defeitos dos materiais e as falhas na regeneração (NIELSEN *et al.*, 1995).

O presente método de obtenção de imagens através de micro-CT para análise de regeneração óssea possui grande aplicabilidade em bioengenharia óssea. As imagens obtidas nesta técnica 3D possuem vantagens também sobre as análises histológicas convencionais e sobre a imagem de RX convencional que possui apenas duas dimensões (2D). A coleta, a reconstrução e a análise morfométrica através da micro-CT podem ser completadas em algumas horas, dependendo do tamanho da amostra e resolução da imagem. Se formos comparar com o método histológico teremos várias etapas e um maior tempo de trabalho que incluem: fixação, confecção do bloco, seccionamento e coloração. Todas estas etapas podem levar uma semana ou mais. Além disso, a micro-CT oferece muitos dados mensuráveis e é um método não destrutivo - totalmente 3D (GULDBERG *et al.*, 2004).

Muito importante ressaltarmos que o método de obtenção de imagens através da micro-CT deve ser encarado como complementar às imagens 2D e não como uma substituição (SCARFE *et al.*, 2009). Mesmo que a microtomografia computadorizada ofereça excelente imagens 3D da morfologia esquelética existem limitações que devem ser consideradas em algumas situações. Por exemplo, detalhes celulares, distribuição espacial de proteínas ou ainda a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) são situações não permitidas por estas imagens. Desta forma as imagens micro-CT e os métodos histológicos se complementam, uma vez que técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ* e a própria histologia padrão são utilizados em vários estudos de forma concomitante (GULDBERG *et al.*, 2004).

Em relação aos tecidos moles, as imagens micro-CT apresentam certas limitações. Neste sentido agentes de contraste podem ser empregados para que tecidos moles, como por exemplo, vasos sanguíneos possam ser detectados nas imagens micro-CT (DUVALL *et al.*, 2004).

Polak *et al.* (2012) propuseram o desenvolvimento e a validação de um algoritmo de segmentação de imagem para micro-CT que de uma maneira precisa e eficiente conseguiu segmentar o tecido ósseo dos biomateriais a base de fosfato de cálcio e do tecido mole. Esse algoritmo permitiu a avaliação quantitativa do crescimento ósseo no interior dos poros do biomaterial. Desta maneira foi possível a detecção de bordas e o conhecimento das relações tridimensionais entre o osso, o biomaterial e o tecido mole

Efeoglu *et al.* (2009) em seu estudo utilizando micro-CT evidenciou que as imagens proporcionaram uma caracterização da mineralização do osso e tem um grande potencial de ser um indicador confiável na qualidade da cicatrização óssea. Neste estudo, os autores avaliaram o potencial de regeneração óssea de três biomateriais: matriz absorvível de policaprolactona pura, matriz policaprolactona reforçada com fibra de vidro 45S5 e policaprolactona reforçada com fibra de vidro fosfatada. Os materiais foram implantados em defeitos de 8mm de diâmetro em calvárias de ratos e analisados através da micro-CT. Além dos resultados mostrarem que a matriz de policaprolactona com fibras de vidro fosfatadas é promissora para aplicações na região craniomaxilofacial, o presente método de micro-CT confirma a reprodutibilidade técnica deste método. Além disso, uma excelente avaliação com as imagens obtidas da formação do novo tecido ósseo através da mineralização e microarquitetura.

No presente momento em que os estudos em bioengenharia óssea prosperam na busca da tríade ideal - matriz, células e fatores de crescimento ósseo-, a micro-CT é uma ferramenta de grande importância para as mensurações ósseas. As imagens obtidas permitem uma análise geométrica precisa, mesmo se a resolução da imagem está acima do tamanho dos poros da matriz. Assim torna-se uma ferramenta importante para compreender o mecanismo de povoamento celular dos biomateriais (BASHOOR-ZADEH, BAROUD & BOHNER, 2010).

Vários novos métodos de processamento de imagem 3D através de micro-CT foram recentemente apresentados para o osso trabecular permitindo a quantificação direta da arquitetura micro estrutural com bastante precisão e facilidade, como, por exemplo, a densidade do volume ósseo, a densidade de superfície óssea e a interconectividade entre as trabéculas (GULDBERG *et al.*, 2008; LU & RABIE, 2003).

No estudo experimental foram realizados defeitos ósseos críticos em coelhos por Efeoglu *et al.* (2007) e ficou caracterizado que a micro-CT é uma ferramenta útil para a aquisição de imagens tridimensionais. As imagens adquiridas foram analisadas de forma morfométrica quantitativa, com mensurações de volume ósseo em mm^3 ; área de superfície óssea em mm^2 ; e densidade de conectividade do novo tecido ósseo nos períodos de 4, 12 e 24 semanas. A caracterização temporal da mineralização do osso tem um papel muito importante na compreensão da fisiologia da mineralização dos ossos no processo de cicatrização, principalmente para materiais degradáveis, bioativos e produtos farmacêuticos que atuam no tecido ósseo.

A microtomografia computadorizada também está sendo empregada nos estudos em humanos para a caracterização e verificação na regeneração óssea. Weiss *et al.* (2007) investigaram a segurança e a eficácia do biomaterial constituído por suspensão de fosfato de

cálcio bifásico para preenchimento de alvéolos dentários humanos após extrações de 11 elementos dentários. Pequenas biopsias das áreas implantadas foram colhidas e analisadas através da micro-CT e histomorfometria. Nas imagens fica caracterizada a substituição gradual do material de preenchimento pelo tecido ósseo, preservando, desta maneira, a altura do rebordo alveolar.

A neovascularização é outro fator a ser avaliado durante a regeneração do tecido ósseo, uma vez que a angiogênese é reponsável e fator desencadeante de neoformação tecidual. Desta maneira, ALT *et al.* (2011) propuseram análise tecidual por micro-CT e nano-CT no modelo de ratos com defeitos críticos de fêmur preenchidos com compósitos de colágeno e sílica durante 6 semanas. Os autores verificaram que apenas a nano-CT de alta resolução demonstrou formação de novos vasos sanguíneos em torno do biomaterial, também confirmado por imunohistoquímica. Neste estudo ocorreu a conclusão de que a nano-CT é viável para análise quantitativa de angiogênese durante integração óssea dos biomateriais e uma ferramenta promissora para o futuro.

O presente estudo realizou como ferramenta as análises com imagens micro-CT para quantificar e qualificar a regeneração óssea, conforme os tratamentos propostos, juntamente com análises histológicas convencionais e RT-PCR.

1.8.2 Histomorfometria

A histomorfometria óssea é uma avaliação histológica quantitativa de uma biópsia óssea calcificada realizada para obter informação sobre a remodelação e a estrutura óssea. O preparo e a análise das amostras necessitam de um laboratório especializado. A histomorfometria pode avaliar parâmetros estruturais e de remodelação óssea, portanto pode fazer uma análise estática e também dinâmica. A presente ferramenta é muito importante para estudos do tecido ósseo e permite avaliar o metabolismo, oferecendo informações que nenhum outro método permite (AM, 1983; DEMPSTER & SHANE, 2001).

Os trabalhos de pesquisa em odontologia, principalmente em implantodontia e cirurgia craniomaxilofacial, que avaliam o tecido ósseo e biomateriais, utilizam a histomorfometria como uma ferramenta para quantificar a regeneração óssea. Após a coleta do material e confecção dos cortes histológicos devidamente processados é possível realizar as análises em programas de computadores para a quantificação de neoformação óssea. Calasans-Maia *et al.* (2014) propuseram a avaliação de xenoenxerto em alvéolos humanos pós extrações em um ensaio clínico controlado. Através da histomorfometria, após 6 meses do uso de 2 tipos de

xenoenxerto, foi possível quantificar a regeneração óssea. O trabalho de Grandi *et al.* (2011) também é um dentre muitos que utilizaram a histomorfometria para avaliar o efeito de biomateriais em defeitos ósseos em modelos animais. Neste estudo foi possível calcular a porcentagem de tecido ósseo na região de calvária de cada defeito e comparar com o grupo controle preenchido apenas com coágulo sanguíneo.

Da mesma maneira que a vasta literatura coloca a histomorfometria como uma poderosa ferramenta para quantificação de regiões enxertadas em tecido ósseo, a presente pesquisa também utilizou esta metodologia com intuito de calcular a área de tecido ósseo regenerado dentro do defeito crítico em fêmures de ratos.

1.8.3 A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis no ano de 1983. Este método tem como objetivo fotocopiar o DNA de forma simples e rápida através de pequenos fragmentos em um tubo de experimento. O PCR é denominado por muitos biólogos moleculares de “fotocopiadora de DNA”, mesmo parecendo simples, trata-se de um complicado processo com muitas reações sensíveis. Portanto, o PCR é um processo complexo que possibilita uma poderosa ferramenta versátil para a manipulação e análises de DNA (MCPHERSON & MOLLER, 2000).

O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento do DNA a ser analisado. O processo do PCR consistirá na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região do ácido nucléico com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores.

O PCR pode ser dividido em 3 principais eventos durante a reação por ciclos:

1- Desnaturação do DNA molde a 95°C: é a fase da desnaturação da fita de DNA que acontece quando a reação é aquecida, sendo essencial para que ocorra a segunda fase do anelamento.

2- Ligação ou anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 64°C: dois oligonucleotídeos iniciadores ligam-se às sequências das bases complementares da cadeia molde. Estes oligonucleotídeos iniciadores são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar.

3- Extensão ou Polimerização do DNA entre 70-72°C: a enzima responsável pela polimerização é a DNA polimerase termoestável (Taq), que foi isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus Aquaticus* e vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima

usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos do PCR têm temperaturas situadas entre 64°C e 95°C. Para executar este ciclo usa-se um termociclador que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Em algumas horas, são repetidos cerca de 30 ciclos (MCPHERSON & MOLLER, 2000).

A técnica de PCR é rápida, relativamente barata e segura, além de elevada sensibilidade e especificidade. Desta maneira, não se faz necessária isolar o DNA que se pretende amplificar, já que a especificidade do PCR é dada pelos oligonucleotídeos iniciadores. Porém, a técnica de PCR também possui algumas limitações e dificuldades, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar. (LIFE TIME CORPORATION, c2012).

Além disso, pode ocorrer com facilidade a contaminação da amostra por DNA estranho, uma vez que se trata de uma técnica muito sensível.

A técnica de reação em cadeia em tempo real (RT-PCR) foi desenvolvida por Higushi em 1993. Nesta técnica é possível identificar o DNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação por fluorescência. O SYBR Green® é um dos compostos fluorescentes mais utilizados e se liga entre a dupla fita do DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador emite uma luz verde. No começo da amplificação, a reação contém DNA desnaturado, oligonucleotídeos iniciadores e o SYBR Green®. Logo após o reconhecimento dos oligonucleotídeos iniciador ocorre a polimerização do DNA e os compostos florescentes (SYBR Green®) se ligam ao DNA polimerizado e o aumento da fluorescência é observado em tempo real. Também ocorre um aumento de especificidade devido a utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. RT-PCR dispensa a corrida em gel de agarose por eletroforese e a fotodocumentação, portanto a amplificação e a detecção do DNA são realizadas de forma simultânea em um sistema fechado. Sendo assim a presente evolução da técnica permite a simplificação da reação e diminuição do risco de contaminação da amostra a ser analisada.

As sondas também são utilizadas na técnica de PCR dita convencionais, a grande diferença para a técnica de RT-PCR é que há a possibilidade de análise da expressão gênica, ao invés de apenas indicar a presença ou ausência do gene de interesse.

Com a técnica RT-PCR é possível medir o número de ciclos necessários para se detectar um sinal específico, chamado de Cycle Threshold (C_T), portanto podemos usá-lo para determinar o nível inicial de um mRNA específico presente no preparo. O C_T é o ponto que permite a quantificação exata na fluorescência, com isso os valores de fluorescência são gravados e representam a quantidade do produto amplificado (LIFE TIME CORPORATION, c2012).

5 CONCLUSÕES

De acordo com o presente estudo apresentado, pode-se concluir que:

- Os achados dos testes *in vitro* comprovaram que o tecido adiposo pode se constituir em uma promissora fonte celular para aplicação em bioengenharia óssea, devido a sua excelente plasticidade, facilidade de coleta e marcadores mesenquimais.

- O teste de viabilidade celular (MTT) do ácido hialurônico (AH) sobre as células-tronco mesenquimais adiposas (CTMAs), possibilitou verificar a segurança no seu uso uma vez que atingiu viabilidade celular acima de 60 % em praticamente todas as concentrações testadas.

- A análise por microtomografia computadorizada (μ -CT) não apresentou diferença significativa entre todos os grupos analisados em relação aos parâmetros VTO (volume de tecido ósseo) e PTO (porcentagem de tecido ósseo).

- Através também da análise por μ -CT foi possível nos parâmetros superfície de contato ósseo (SCO) e densidade de superfície óssea (DSO) constatar diferença significativa nos grupos tratados com CTMAs em relação ao grupo controle negativo e ao grupo apenas AH.

- Os achados histológicos foram coincidentes com os achados por μ -CT nos parâmetros SCO e DSO, pois os grupos na presença das CTMAs tiveram melhor desempenho e com valores maiores estatisticamente que o grupo controle negativo e o grupo apenas AH.

- Associação entre as CTMAs e o AH proporcionou um efeito sinérgico na regeneração do tecido ósseo neste modelo experimental.

- O teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) não apontou diferença estatística para o gene que codifica o colágeno 1 α -1 (Cal 1A) e o gene que codifica a osteopontina (OP). Entretanto, em relação ao gene que codifica a osteonectina foi possível identificar uma diferença significativa com valores inferiores para o grupo apenas CTMAs e ao grupo AH + CTMAs sem osteoindução em relação ao grupo AH + CTMAs previamente induzidas.

- Os resultados indicam ser desnecessária a osteoindução prévia *in vitro* das CTMAs para aplicação em bioengenharia óssea.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad