

PONTIFÍCIA UNIVERIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA
HUMANA CULTIVADAS SOBRE DIFERENTES SUPERFÍCIES DE
TITÂNIO**

Rodrigo Gomes Beltrão

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado
Orientadora

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, pela minha família e por ter a oportunidade de ajudar o próximo a recuperar sua saúde e sorrir.

Aos meus pais, **Gilson e Maria Cecília**, meus maiores exemplos, fonte de amor, carinho e confiança. Os valores espirituais, sociais e profissionais ensinados ao longo destes anos me ajudaram a crescer e conquistar meus sonhos. Devo a vocês a minha vida.

À minha amada **Helena**, a maior incentivadora deste trabalho. Tua ajuda e carinho nos momentos difíceis e em todas as fases do curso foram fundamentais e nos fortaleceram. Esta conquista também é tua.

Ao meu **filho** que chegará no próximo ano. A tua luz foi a inspiração que faltava para a finalização desta obra.

Ao meu irmão **Renan**, que ao meu lado cresceu, dividindo todos os momentos mais importantes. A distância não separa os corações.

À Profa. Dra. **Denise Cantarelli Machado**, agradeço por tua paciência, dedicação e amizade. Tua dedicação à pesquisa, simplicidade e carinho pelos que te cercam é marcante e me servem de exemplo. Obrigado pelos ensinamentos e pela oportunidade da tua orientação nesta pesquisa.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da FO-PUCRS. Seus ensinamentos contribuíram muito para minha formação.

Ao meu amigo **Christian Viezzer**, tua ajuda e incentivo durante esta etapa e a participação incansável e fundamental durante o processo de cultura celular foram importantíssimas e serei eternamente grato por isso.

Ao meu colega e amigo **Guilherme Fritscher**, com o qual tive a oportunidade de dividir conhecimentos e publicações durante este período.

Ao amigo **Dr. Rafael Ott**, obrigado pela participação neste estudo na etapa de coleta das células da medula óssea.

Ao colega e amigo **Paulo Henrique Luis de Freitas**, tua ajuda, incentivo e exemplo foram fundamentais.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul por proporcionar o curso de doutorado. Aos Irmãos, Reitores, Diretores, Professores e Funcionários, todo o meu agradecimento. O material humano de uma instituição é o que ela tem de mais valioso.

Aos funcionários do Hospital São Lucas.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da FO-PUCRS, Ana Prestes, Davenir Bruschi, Marcos Correia e Carlos Minossi pela ajuda dada ao longo deste curso.

À CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

À Biomet 3i do Brasil e Odontontodis LTDA, pelo apoio financeiro para este trabalho.

RESUMO

Os implantes osseointegrados, em sua maioria, possuem algum tipo de condicionamento da sua superfície que visa melhorar a osseointegração. O mecanismo de diferenciação celular *in vitro* de células mesenquimais em osteoblastos já é bastante conhecido e serve para avaliação das propriedades de osteoindução e osteocondução de biomateriais. O presente estudo tem por objetivo avaliar a adesão, proliferação e diferenciação das células da medula óssea humana em superfícies de implantes de titânio com e sem deposição discreta de fosfato de cálcio. As células foram obtidas a partir da medula óssea de um doador humano. Foram selecionados 12 discos de titânio do tipo *Bonelike*® (Biomet 3I, Brasil) com superfície tratada por duplo ataque ácido; *Osseotite*™ (Biomet 3I, USA) com superfície tratada por duplo ataque ácido e *Nanotite*™ (Biomet 3I, USA). Após 14 e 21 dias de cultura foi realizado PCR em tempo real para avaliação da diferenciação celular e microscopia eletrônica de varredura para avaliação da proliferação e adesão celular aos discos de titânio. Os resultados indicaram que a rugosidade da superfície dos discos de titânio possibilita a adesão, diferenciação e proliferação celular, que a síntese de ALP é maior na superfície *Bonelike* e que as partículas de fosfato de cálcio demonstraram maior grau de síntese de BGLAP e proliferação celular.

Palavras – Chave: célula da medula óssea, superfícies de implantes, osteoindução, titânio.

ABSTRACT

Given that the majority of osseointegrated implants undergo some type of surface conditioning in order to improve osseointegration and that in vitro differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts is a mastered process that has been used for evaluating a given biomaterial with regard to its osteoinductive and osteoconductive capabilities, the present work aims to evaluate the adhesion, proliferation and differentiation of human bone marrow cells on titanium implant surfaces that have or have not been treated by discrete calcium phosphate deposition. Human bone marrow cells obtained from a single donor were cultured in media containing 12 titanium discs of one of the following: the Bonelike® (Biomet 3I, Brazil) with a surface treated by double acid etching; the Osseotite™ (Biomet 3I, USA) with similar surface treatment and the Nanotite™ (Biomet 3I, USA). After 14 and 21 days of culture, real time PCR and SEM examinations were performed. From the results we concluded that implant surface roughness allows cell adhesion, differentiation and proliferation, the ALP synthesis is higher in Bonelike® and the presence of calcium phosphate nanoparticles on an implant surface leads to enhanced BGLAP synthesis and cell proliferation.

Key – Words: marrow cells, implants surfaces, osseointegration, titanium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Remoção de sangue medular da crista do íliaco.	38
Figura 2: Separação das células medula óssea humana.	39
Figura 3: Células medula óssea humana separadas.	40
Figura 4: Discos de titânio cortados e colocados em cultura.	41
Figura 5: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Bonelike</i> aos 14 dias de cultura.	47
Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Bonelike</i> aos 21 dias de cultura.	48
Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Osseotite</i> aos 14 dias de cultura.	48
Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Osseotite</i> aos 21 dias de cultura.	49
Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Nanotite</i> aos 14 dias de cultura.	49
Figura 10: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante <i>Nanotite</i> aos 21 dias de cultura.	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Expressão da Fosfatase Alcalina (ALP) nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio. 45
- Gráfico 2:** Expressão da Osteocalcina (OC) nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição por grupos dos discos de titânio por unidades nos dias de cultura.	42
Tabela 2: Expressão da Fosfatase Alcalina nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio.	46
Tabela 3: Expressão da Osteocalcina nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase Alcalina
β-2M	Beta-2 microglobulina
BGLAP	Osteocalcina
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP-4	Proteína morfogenética óssea-4
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMI	Células Mesenquimais Indiferenciadas
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO₂	Dióxido de carbono
°C	Graus centígrados
OM	Dexametasona/ácido ascórbico/β-glicerolfosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dnase	Deoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
dT	Dideoximidina
DTT	Ditiotreitol

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
FBS	Soro fetal bovino
G	Força gravitacional
GLA	Proteína óssea gama carboxi-glutâmica
H₂O	Água
kDa	Quilo-dalton
M	Molar
rhBMP-4	Proteína morfogenética óssea/4 humana recombinante
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
OC	Osteocalcina
p/v	peso/volume
PBS	Salina tamponada com fosfato
PLA	<i>“Processed lipo-aspirate”</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
rh	Recombinante humana

RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SPP1	Osteopontina ou sialoproteína I
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-β
U	Unidade
USA/EUA	United States of América / Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
VK	Von Kossa
μL	Microlitro
μm	Micromolar
®	Marca registrada
%	Por cento
™	<i>“Trade mark”</i>

SUMÁRIO:

SUMÁRIO:

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
3. REVISTA DA LITERATURA	22
3.1 Tecido Ósseo	23
3.2 Células Mesenquimais Indiferenciadas	24
3.3 Células Osteoprogenitoras	26
3.3.1 Pré-osteoblastos	27
3.3.2 Osteoblastos	27
3.4 Osteoindução	30
3.5 Marcadores da linhagem osteogênica	31
3.6 Superfícies de Titânio	32
4. METODOLOGIA	36
4.1 Considerações Bioéticas	37
4.2 Hipóteses	37
4.3 Amostra	38
4.3.1 Obtenção das células da medula óssea	38
4.3.2 Discos de Titânio	40
4.3.3 Composição dos grupos experimentais	41
4.4 Cultura das células da medula óssea sobre discos de titânio	41
4.5 Extração do ácido ribonucléico (RNA) total	42
4.6 Síntese do ácido deoxirribonucléico complementar (cDNA)	42
4.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	42
4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células da medula óssea humana em cultura sobre superfícies de titânio	43
5. RESULTADOS	48
5.1 Expressão da proteína fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina através de PCR em tempo real	45
5.2 Avaliação de adesão e morfologia celular por MEV	47
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXOS	65

INTRODUÇÃO:

1. Introdução:

O desenvolvimento tecnológico e científico da odontologia nas áreas de implantodontia e cirurgia bucomaxilofacial para o tratamento de deficiências ósseas que acometem uma grande quantidade de pacientes crescem de modo acelerado em todo o mundo. Com a descoberta do fenômeno da osseointegração, a reabilitação estética, funcional e psicológica tornou-se possível e hoje é uma realidade difundida e comprovada clínica e cientificamente.

Atualmente, com o advento e domínio da biologia molecular, da engenharia genética e das pesquisas de diferenciação celular a partir de células-tronco, a odontologia está entrando em uma nova fase onde os tratamentos de regeneração tecidual serão cada vez mais previsíveis, com melhores resultados e procedimentos menos invasivos. Para tanto, cada vez mais o conhecimento do fisiologismo humano se faz necessário. Entender o metabolismo celular, a síntese de proteínas, as substâncias reguladoras das células e a gênese das mesmas são o caminho a ser percorrido.

O tecido ósseo está constantemente passando por um processo morfológico dinâmico seguindo sua formação original. Desta forma, o metabolismo ósseo é mantido por um processo constante de reabsorção e neoformação em resposta a mudanças físicas e biomecânicas. Este evento é controlado por dois mecanismos: regulação sistêmica e local, através de hormônios reguladores dos níveis de cálcio e fosfato. Junto a isso ainda existem os fatores de crescimento que atuam sobre todas as células da estrutura óssea ajudando no processo de reparo tecidual. (1-3).

O ciclo de vida de uma célula mesenquimal indiferenciada é um processo regulado por cinco atividades fundamentais: ativação, proliferação, imigração, diferenciação e sobrevivência (ou morte). (4).

O mecanismo de diferenciação celular *in vitro* de células da medula óssea humana em osteoblastos já é dominado com a utilização de rhBMP-4. Esta proteína óssea sintetizada em laboratório interfere positivamente nos períodos iniciais de cultura. (5)

Atualmente algumas pesquisas têm conseguido cultivar estas células diferenciadas em estruturas pré-fabricadas que as mantenham vivas e que possam ser enxertadas em defeitos ósseos. Desta forma poderão ser produzidos materiais de enxertia que contenham células ósseas e que dêem as cirurgias de enxerto ósseo um prognóstico mais favorável e não dependam de acessos a áreas doadoras. (6-8)

Os implantes osseointegrados, em sua maioria, possuem algum tipo de condicionamento da sua superfície que permite uma maior área de contato ósseo com o implante. Além disso, as microrrugosidades das superfícies dos implantes permitem maior adesão da rede de fibrina formada no primeiro estágio da osseointegração. Esta rede de fibrina é que permite uma migração mais efetiva dos osteoblastos até a superfície do implante. Desta forma, a neoformação óssea sobre estas estruturas se dá de maneira organizada e mais rápida uma vez que as células tornam-se polarizadas em direção ao implante (9).

Atualmente existe uma série de diferentes tratamentos das superfícies dos implantes te que vão desde a subfração por ataque ácido até a deposição discreta de nanopartículas de fosfato de cálcio nestas superfícies.

Novas pesquisas têm surgido, demonstrando resultados promissores na osseointegração de implantes com deposição discreta de fosfato de cálcio em suas superfícies. (10-12)

Portanto, esta pesquisa tem o objetivo principal de cultivar células de medula óssea humana em diferentes tipos de superfícies de titânio e avaliar a sua proliferação e diferenciação em células ósseas.

OBJETIVOS:

2. Objetivos:

2.1 Avaliar a adesão e proliferação das células da medula óssea humana em superfícies de implantes de titânio;

2.2 Avaliar a diferenciação em osteoblastos das células da medula óssea humana em superfícies de implantes de titânio.

REVISTA DA LITERATURA:

3. Revista da Literatura:

3.1 Tecido Ósseo:

O osso difere-se dos demais tecidos que compõe o corpo humano por uma extraordinária capacidade de crescer e manter contínuos remodelamento e regeneração. Assim, os ossos mantêm sua forma e propriedades físicas. (13)

O metabolismo ósseo envolve um processo contínuo de reabsorção e neoformação ósseas onde dois mecanismos têm sido postulados para o controle desse processo: a regulação sistêmica, que é realizada por meio de hormônios reguladores da taxa de cálcio e fosfato, e regulação local, onde a participação de fatores de crescimento que atuam sobre células mesenquimais indiferenciadas resultará no processo conhecido de neoformação óssea. (1)

O tecido ósseo é um tecido complexo que está constantemente passando por um processo morfológico dinâmico, seguindo sua formação inicial, seu crescimento, seu reparo e sua remodelação, em resposta a mudanças físicas e biomecânicas sofridas pelo corpo humano. (14)

O esqueleto humano está sujeito à constante remodelação, objetivando manter o tecido ósseo com suas propriedades biomecânicas inalteradas. O remodelamento e a cicatrização de fraturas ósseas são exemplos da capacidade regenerativa do tecido ósseo graças à atuação das células mesenquimais indiferenciadas estimuladas por fatores de crescimento. (15-16)

O tecido ósseo possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma integração dinâmica de processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual óssea que vão determinar a capacidade de osteoindução: sinais osteoindutores solúveis

viabilidade das células mesenquimais indiferenciadas em responder e ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, além da produção de uma matriz extracelular adequada. (17)

3.2 Células Mesenquimais Indiferenciadas

As células mesenquimais indiferenciadas (CMI) são células progenitoras pluripotentes, que têm a propriedade de dividirem-se muitas vezes e em diversas linhagens para a formação de tecidos esqueléticos, como, por exemplo, cartilagem, osso, tendão, ligamento, estroma da medula óssea e tecido conjuntivo. Essas células não são governadas por si só ou limitadas a um número fixo de divisões mitóticas; a sua progênie é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos que, combinados, são responsáveis pelo controle da expressão dos padrões molecular e celular, resultando em tecidos específicos, com funções também específicas, com base no seu repertório molecular. Ademais, durante a progressão da célula mesenquimal indiferenciada até a finalização de seu fenótipo, ela sofre a influência da regulação parácrina e da regulação autócrina, quando a soma de todos esses sinais intrínsecos e extrínsecos define o desenvolvimento e o fenótipo celulares. (18)

Além disso, o tecido ósseo adulto contém fatores que estimulam o reparo ósseo, recapitulando o desenvolvimento embriológico e a morfogênese. (19)

As CMIs quando cultivadas *in vitro* e têm demonstrado a capacidade de dar origem aos fenótipos celulares diferenciados das camadas germinativas do embrião. Através de estudos com cultura de CMIs adultas retiradas da medula óssea da crista de íliaco de doadores humanos observou-se que a medula óssea adulta contém uma quantidade de CMIs que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais como osso e cartilagem. Esse processo de diferenciação é influenciado, significativamente, por nutrientes basais, densidade celular,

organização espacial, forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas. (5,16, 20-22)

No estroma da medula óssea encontra-se uma população heterogênea de células que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Algumas destas células apresentam características de células-tronco e possuem a propriedade de diferenciarem-se em osso, cartilagem, adipócitos, além de atuarem como um suporte hematopoiético para os tecidos. (23)

As CMIs são passíveis de regeneração do tecido ósseo. Assim, um meio embrionário em tecidos adultos lesados pode ser recriado. Além disso, os autores salientaram que tais células têm propensão a se aderir em cultura, permitindo-se isolarem-se de outras células medulares, sendo possível verificar a sua proliferação e a diferenciação não só em osteoblastos, mas também em condroblastos, mioblastos e adipócitos. (24)

Células hematopoiéticas estão amplamente associadas com células do estroma da medula óssea, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, quando essas células do estroma estão em cultura, as hematopoiéticas bem diferenciadas são normalmente removidas por técnicas de lavagens seletivas e aderência. (23, 25)

Em estudo realizado *in vitro* onde as células derivadas da medula óssea foram transfectadas com o vetor de adenovírus recombinante contendo a BMP-2 humana foram colocadas em cultura, observou-se claramente a proliferação e a diferenciação osteogênica das CMIs, enquanto que, *in vivo*, tais células, depois de transplantadas no rádio de ratos, foram capazes de formar osso e cartilagem, além de regenerar defeitos ósseos. (26)

Alguns autores destacam que a medula óssea contém células com um grande potencial osteogênico, incluindo células precursoras osteogênicas totalmente comprometidas com a osteogênese. (27,28)

Até atingirem a formação do adulto, as células-tronco vão se tornando progressivamente restritas em sua capacidade de diferenciação, ficando cada vez mais comprometidas com uma determinada função. Inicialmente, as populações de células-tronco confinadas a um seletivo grupo de tecidos (endoderma, ectoderma ou mesoderma) são multipotentes, porém, com o processo de desenvolvimento, algumas delas podem permanecer pluripotentes, capazes de se diferenciar em uma ou mais linhagens. Outras células tornam-se progressivamente limitadas, com a capacidade de gerar somente um tipo celular. Essa restrição parece ser o resultado de mudanças adaptativas críticas e irreversíveis no núcleo celular. (4)

3.3 Células Osteoprogenitoras

A maioria das osteoprogenitoras presentes nas células da calvária de fetos de ratos e derivadas do estroma da medula óssea de ratos adulto jovens em cultura tem capacidade de renovação e tempo de vida limitados. Evidências sugerem que existem, no mínimo, dois tipos distintos de populações de osteoprogenitores. Uma população com capacidade de promover diferenciação *in vitro* e outra, aparentemente menos diferenciada, que sofre diferenciação osteoblástica somente após estímulos indutores específicos como dexametasona, outros esteróides e fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas. Tais substâncias aumentam o número de nódulos ou colônias ósseas nas culturas de estroma da medula óssea e da calvária de ratos. (25, 29)

A maioria das pesquisas aponta que as CMIs, quando em cultura e na presença de citocinas ativadoras do osso, sofrem osteopoiese, processo esse que envolve a proliferação e a maturação de células precursoras primitivas até a formação de osteoblastos funcionais, sendo que as células ósseas originadas das

CMIIs comprometidas com a osteogênese são as células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. O autor acredita que, pelo fato de essas células apresentarem um desenvolvimento contínuo ilimitado, não há, conseqüentemente, diferença de comportamento entre elas. (27)

O caminho da diferenciação osteoblástica é modulado por interações entre células progenitoras (osteoprogenitoras), suas vizinhas, a matriz envolvida e uma ampla extensão de fatores solúveis, incluindo o de crescimento e transformação- β (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), o semelhante à insulina II (IGF-II), várias interleucinas, ácido retinóico, glucocorticóides, estrógeno, hormônios da paratireóide, vitamina D e tiroxina. Vários membros da família das BMPs são altamente efetivos nessa diferenciação. (4).

3.3.1 Pré-osteoblastos

Os pré-osteoblastos representam um estágio de transição entre uma alta proliferação de células osteoprogenitoras e osteoblastos maduros, apresentando baixos níveis de proteínas ósseas, como a fosfatase alcalina, a osteonectina e a osteopontina, entre outras. Os pré-osteoblastos são predominantemente definidos, morfológicamente baseados em sua localização adjacente à atividade dos osteoblastos. Além do mais, essas células fornecem importantes informações à resposta de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização. (27)

3.3.2 Osteoblastos

As células osteoblásticas apresentam uma grande diversidade de morfologias e atividades indo desde pré-osteoblastos com sua forma poligonal, osteoblastos cuboidais, osteoblastos sintetizadores de matriz e osteócitos de matriz embebidos na porção mineral até células que recobrem o osso, achatadas e finas. Esses inúmeros morfotipos são geralmente considerados diferentes

estágios de maturação de uma única linhagem celular originada da proliferação e da diferenciação de células osteoprogenitoras. (30)

Apesar de a exata seqüência de eventos ainda não ter sido completamente entendida, acredita-se que os osteoblastos derivem de células-tronco pluripotentes da medula óssea, por meio de um caminho de diferenciação compreendido por uma série de estágios osteoprogenitores e pré-osteoblásticos. (31)

Análises cinéticas em colônias em crescimento celular mostraram que os osteoprogenitores sofrem de nove a 10 alterações de população antes de surgir o primeiro osteoblasto morfológicamente diferenciado nesta colônia em desenvolvimento. (32)

Estudos sobre o efeito da idade na formação óssea ectópica induzida por BMPs em ratos com um mês, 10 meses e 18 meses de vida, constataram que a velocidade e a quantidade dessa formação de osso é reduzida significativamente pelo avanço etário. A redução no anabolismo pode ser atribuída às mudanças nos níveis de hormônios e dos fatores de crescimento. Dois mecanismos têm sido postulados como principais causadores da diminuição da formação óssea ectópica: a idade, que pode reduzir a migração de CMLs, diminuindo o número de precursores osteogênicos, bem como a incapacidade de células osteogênicas para responder às BMPs. (33)

Os osteoblastos são células especializadas que atuam diretamente sobre a formação óssea nos vertebrados. O tecido ósseo consiste, principalmente, de cristais de hidroxiapatita e vários tipos de proteínas na matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e proteoglicanos. Tanto esses cristais de hidroxiapatita quanto as proteínas são regulados pelos osteoblastos e, além disso, a alta atividade enzimática da fosfatase alcalina e a resposta a hormônios e a citocinas são características importantes dos osteoblastos. (34)

A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas elas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos. (35)

Durante a embriogênese, o tecido ósseo é formado por dois caminhos distintos: ossificação intramembranosa e endocondral. Independentemente disso, os osteoblastos desempenham um único papel na formação de osso. (19)

No processo de ossificação intramembranosa, os osteoblastos são diferenciados diretamente das CMLs. Contudo, no processo de ossificação endocondral estas células mesenquimais diferenciam-se, primeiro, em condrócitos, que formam uma matriz cartilaginosa onde os osteoblastos são diferenciados imediatamente após a maturação hipertrófica destes condrócitos. Este processo de desenvolvimento ósseo e cartilaginoso sugere que osteoblastos e condroblastos têm origem de um mesmo progenitor celular. (34,36)

Quando mantidas sob condições de cultura adequadas, as células do estroma da medula óssea de camundongos são capazes de formarem nódulos ósseos. Estes representam o produto final da proliferação e da diferenciação das células osteoprogenitoras, relativamente raras, presentes no início da população celular. O processo de formação desses nódulos ósseos é dividido em três estágios de desenvolvimento: a proliferação, o desenvolvimento da matriz extracelular e a maturação e mineralização. O processo caracteriza-se por diferentes genes associados à proliferação, à atividade do ciclo celular, bem como à atividade e à heterogeneidade dos osteoblastos. (37)

Quando BMPs são implantadas em tecido subcutâneo de ratos, as CMLs são estimuladas a criar um processo similar à ossificação endocondral. No entanto, têm aumentado as evidências de que as BMPs podem induzir formação

óssea diretamente, sem a seqüência endocondral. As pesquisas demonstraram que, em todos os grupos de ratos nos quais a BMP foi implantada, ocorreu ossificação intramembranosa. (33)

Os osteoblastos são células primárias responsáveis pela formação óssea, originadas de células mesenquimais osteoprogenitoras localizadas dentro do tecido esquelético. Estudos demonstraram uma significativa resposta osteogênica com alta atividade de fosfatase alcalina, deposição de cálcio e formação de nódulos ósseos, em pesquisa *in vitro*.(5,38)

3.4 Osteoindução

A osteoindução é o processo que sustenta a mitogênese de células mesenquimais indiferenciadas induzindo a formação de células osteoprogenitoras com capacidade de formar novo osso. Diferentemente de materiais osteocondutores, substâncias osteoindutoras provocam a formação óssea em locais extra-esqueletais. (39)

A indução óssea é caracterizada por uma seqüência de fases que são a quimiotaxia, a mitose e a diferenciação em cartilagem e/ou osso. A quimiotaxia e a migração das células mesenquimais ocorrem no primeiro dia; a proliferação (mitose), até o terceiro dia; a diferenciação em condroblastos, no quinto dia; a cartilagem hialina, no sétimo dia; a calcificação da matriz hipertrófica da cartilagem, no nono dia; a invasão vascular e angiogênese, no décimo dia; a formação óssea no décimo e décimo primeiro dias; a remodelação do osso, no décimo segundo ao décimo oitavo dia e a diferenciação *in situ* da medula hematopoiética, do décimo oitavo ao vigésimo primeiro dia. (19)

Pesquisas sobre o efeito osteoindutor da BMP-2 recombinante em culturas primárias de osteoblastos da calvária de fetos de ratos durante 20 dias perceberam que essa linhagem osteoblástica sofreu um processo de proliferação

e diferenciação, tendo produzido nódulos ósseos que tinham a característica de um osso trabeculado normal. (40)

A osteoindução caracteriza-se pela habilidade que algumas moléculas possuem de promover a formação óssea. A osteoindução, para que ocorra, não depende somente das células do hospedeiro, mas, também, da presença de CMIs no local. A potencialidade da osteoindução vai depender da habilidade que uma certa molécula e um determinado local tem para induzir células mesenquimais indiferenciadas a formar osso. Para os autores, a formação óssea é influenciada por muitos fatores, sendo o suprimento sangüíneo o mais importante, pois aumenta a oxigenação tecidual e, conseqüentemente, a formação de colágeno, a proliferação de fibroblastos e capilares, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, além da formação e da mineralização do calo ósseo. (41,42)

3.5 Marcadores da linhagem osteogênica

A osteopontina (SPP1) que é uma glicoproteína fosforilada pela matrix extracelular mineralizada dos osteoblastos durante o desenvolvimento ósseo, em que seu aumento é regulado pela vitamina D. Ela tem um papel crucial na larga escala de formação da hidroxiapatita. (43)

A expressão da osteopontina é regulada fortemente em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular. E numerosos outros fatores são conhecidos como estimuladores, por exemplo, fosfatase alcalina que cliva fosfatos e permite um meio básico para o início da mineralização. (44)

A osteocalcina (BGLAP), também conhecida como ácido gama carboxi-glutâmico, é uma proteína de ligação com cálcio dependente de vitamina K. Quimicamente, apresenta peso molecular de 6kDa e 49 aminoácidos. Ela tem em sua conformação 3 ácidos gama carboxi(GLA) nas posições 17, 21 e 24 que são

conhecidos como mediadores fortes da ligação com hidroxiapatita, fosfato de cálcio. Sendo assim, ela é descrita como um promotor e inibidor da mineralização. Essa proteína é produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea; representado 20% das proteínas de matriz não colagenosa. (45)

3.6 Superfícies de Titânio

A topografia microscópica das superfícies de titânio afeta a ativação, adesão, orientação, morfologia e os movimentos celulares, bem como, a expressão de genes. As modificações de superfície ainda podem recrutar os tipos certos de células, manipular a expressão genética e comunicação entre as células e finalmente guiar as propriedades dos tecidos neoformados (46-48).

A expressão de fosfatase alcalina de células ósseas é maior em discos de titânio com superfície rugosa do que em discos polidos quando colocados na presença de BMP2. Neste mesmo estudo, a expressão da osteocalcina foi mais rápida nos discos com tratamento de superfície. (48)

A rugosidade do titânio modula a resposta celular para fatores locais e sistêmicos provocando mudanças na expressão fenotípica e no estado de maturação. (49)

A topografia das superfícies de implante tem efeitos distintos não só na produção de mediadores químicos pelas células em contato, mas também na atividade celular de células distantes o que caracteriza um efeito biorreator. (50)

A caracterização da superfície dos biomateriais é particularmente importante para entender a biocompatibilidade dos mesmos. A modificação das

superfícies pode dar-se de várias formas e através das suas características poderá haver maior ou menor interação com as células ósseas. (51)

Partículas de fosfato de cálcio na superfície de bioateriais aceleram a cicatrização óssea provavelmente por um aumento da taxa de osteocondução maior do que a taxa de formação óssea por si. (52)

A deposição de partículas de fosfato de cálcio em implantes de titânio traz um efeito benéfico para a resposta de neoformação óssea durante a fase de cicatrização. Além disso, a resposta óssea à superfície dos implantes depende muito do local onde estes serão instalados. (53)

Após avaliação da manifestação de genes de células mesenquimais e pré-osteoblasticas em diferentes tipos de superfície de implantes, constatou-se que a rugosidade da superfície interfere na expressão de proteínas como a fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. Contudo, a manifestação destas proteínas não se dá de maneira semelhante entre os tipos de superfícies avaliadas, havendo maior manifestação de cada uma delas em cada uma das três superfícies avaliadas. (54)

A rugosidade das superfícies de biomateriais em culturas celulares pode promover um atraso na manifestação genética - incluindo a fosfatase alcalina - e na sua proliferação. Contudo, não há bloqueio da atividade celular. (55)

A reação do corpo ao material estranho implantado é governada por um número de fatores que determinam se o implante vai ser aceito ou rejeitado pelo organismo e se vai cumprir a sua função específica de suportar cargas mastigatórias. Este é um dos maiores desafios principalmente no tratamento de maxila atróficas. (56)

Ao ser avaliada a força necessária para remover implantes de superfícies de duplo ataque ácido com e sem deposição discreta de fosfato de cálcio foi demonstrado que, em tecido ósseo de ratos Wistar, a presença de fosfato de cálcio na superfície dos implantes de titânio aumenta a força de osseointegração. (10)

Na mesma linha de pesquisa, agora com humanos, as mesmas superfícies foram avaliadas. Implantes foram colocados na região de tuberosidade da maxila e após dois meses a área de contato ósseo foi medida. Os resultados foram significativamente maiores nos implantes com nanopartículas de fosfato de cálcio, o que segundo os autores demonstra uma osseointegração mais rápida dos mesmos. (11)

A diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea em superfícies de titânio tratadas com jateamento de sílica e ataque ácido e na mesma superfície acrescida de cristais de hidroxiapatita foi estudada *in vitro*. Os resultados mostraram que, na presença de partículas de hidroxiapatita na superfície dos implantes, o fenótipo celular osteoblástico e a proliferação celular mostraram-se significativamente maiores. (57)

Silva (2009) relatou que discos de titânio com diferentes tipos de condicionamento ácido também manifestaram proliferação celular e síntese de osteocalcina e osteopontina em relação a discos de titânio polido em cultura de células mesenquimais na presença de BMP4. O estudo concluiu que a rugosidade dos implantes acelera o processo de diferenciação celular, mas não o de proliferação. (58)

A Superfície NanoTite™ aumenta as propriedades de cicatrização do tecido periimplantar em locais de osso nativo maxilar quando comparada à superfície Osseotite™. Esta diferença não foi percebida em locais de osso enxertado. (59)

Em estudo realizado em cães para avaliação da formação óssea periimplantar de implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido em comparação com a mesma superfície acrescida de depósito de cristais de fosfato de cálcio, não se observou diferença na neoformação óssea entre os dois tipos de superfície. (60)

De acordo com Schwarz (2009), uma camada de partículas de fosfato de cálcio reabsorvível em contato com superfícies rugosas de titânio aumenta significativamente a área de contato ósseo ao redor dos mesmos. Isto foi verificado após 12 semanas de osseointegração destes implantes em fêmur de porcos. (61)

Em estudo realizado para a avaliação do contato ósseo em implantes com tratamento de superfície por ataque ácido e na mesma superfície com deposição de cristais de fosfato de cálcio colocados imediatamente após a exodontia de prés-molares de cães, pode-se afirmar que não houve diferença entre as superfícies em 4, 6 e 8 semanas. Desta forma, conclui-se que o local de implantação (tamanho do alvéolo) tem maior influência no tratamento e que o acréscimo de nanopartículas de fosfato de cálcio tem efeito limitado no processo de osseointegração. (62)

A presença de nanopartículas de hidroxiapatita em estruturas de poli epsilon caprolactone promoveu maior manifestação da fosfatase alcalina e a atividade de osteocalcina em culturas de células mesenquimais de polpa dentária em relação às mesmas estruturas sem as nanopartículas. (63).

METODOLOGIA:

4. Metodologia

4.1 Considerações Bioéticas

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (*Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS; 2002*). Neste estudo foram utilizados as mesmas células que foram usadas para o projeto de pesquisa: Estudo in vitro sobre osteoindução e osteocondução utilizando células de medula óssea associada a um meio de osso homólogo, já aprovado pela comissão científica deste curso e pelo comitê de ética em pesquisa da PUCRS sob registro CEP: 06/03481.

4.2 Hipóteses

H1 – As células da medula óssea humana aderem e diferenciam-se sobre a superfície rugosa de implantes de titânio;

H2 – A presença de nanopartículas de fosfato de cálcio na superfície dos implantes aumenta a proliferação celular;

H3 – A presença de nanopartículas de fosfato de cálcio na superfície dos implantes aumenta a diferenciação celular;

4.3 Amostra

4.3.1 Obtenção das células da medula óssea:

As células utilizadas nesta pesquisa foram obtidas a partir da medula óssea do osso do íliaco de um doador humano voluntário, submetido à cirurgia de enxerto ósseo em maxila. Este procedimento não acarretou ao paciente maior morbidade ou riscos pós-operatórios.

Após acesso cirúrgico à área doadora, foi realizada uma punção na medula óssea através da cortical óssea com um trocarer onde estava acoplada uma seringa de 20 mL contendo 0,05 de heparina. (Figura 1)



. Figura 1: Remoção de sangue medular da crista do íliaco.

Foi removida uma quantidade de sangue medular de aproximadamente 60 mL. O material foi transferido para um tubo estéril e armazenado em banho de gelo até sua separação em gradiente de densidade. (Figura 2)

As células foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics, USA). Para tanto, as células foram re-suspensas com um volume igual ao de medula com meio de cultura D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media; Invitrogen, USA), colocadas sobre ½ do volume de Histopaque® e centrifugadas a 400g durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 50 mL de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Invitrogen, USA) e centrifugada a 1500 rpm por 3 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul-tripán em hemocítômetro (Optik Labor, USA) e as células ressuspensas a uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/mL.

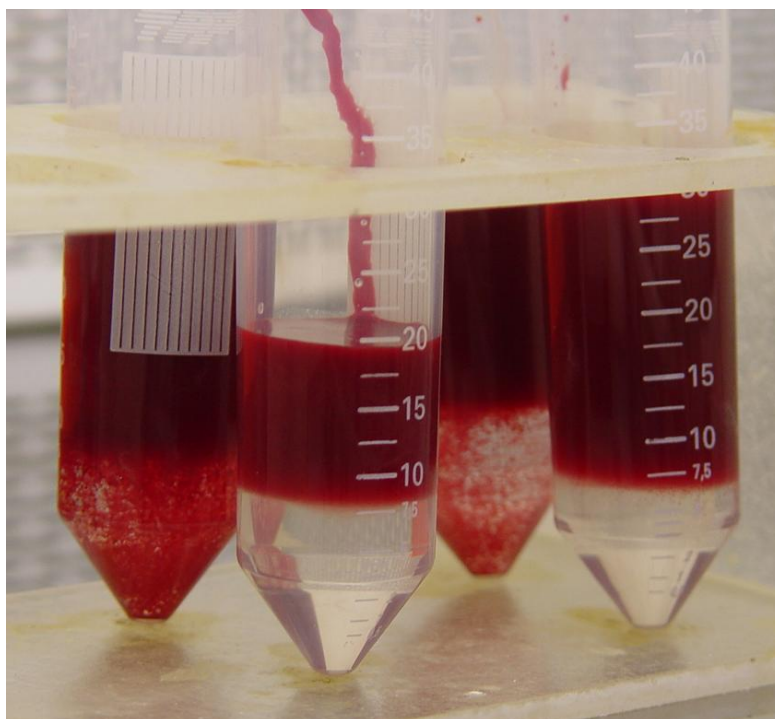


Figura 2: Separação das células da medula óssea.

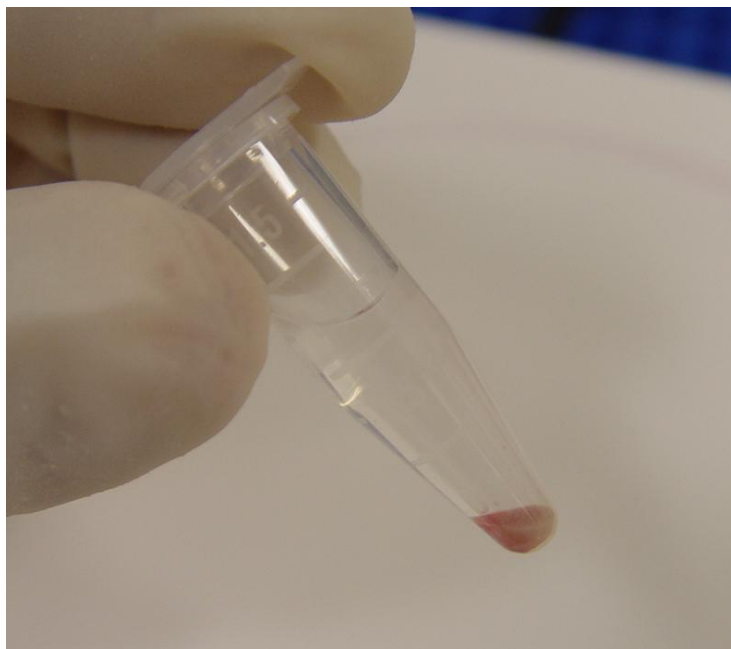


Figura 3: Células da medula óssea separadas.

4.3.2 Discos de titânio

Foram selecionados 12 implantes de titânio da marca comercial Biomet 3I com tratamentos de superfícies diferentes. Os implantes eram do tipo *Bonelike*® (Biomet 3I, Brasil) com superfície tratada por jateamento com óxido de alumínio e ataque ácido por ácido sulfúrico; *Osseotite*™ (Biomet 3I, USA) com superfície tratada por duplo ataque ácido por ácido sulfúrico e ácido clorídrico e *Nanotite*™ (Biomet 3I, USA) com superfície tratada por duplo ataque ácido como a Osseotite, porém com a deposição discreta de nanopartículas de fosfato de cálcio (Tabela 1).

Todos os implantes tinham 04 mm de diâmetro e tiveram seus ápices cortados em uma espessura de 01 mm. Este procedimento ocorreu em uma câmara de fluxo laminar classe IIA, com material estéril e sob irrigação constante com solução fisiológica 0,9%.

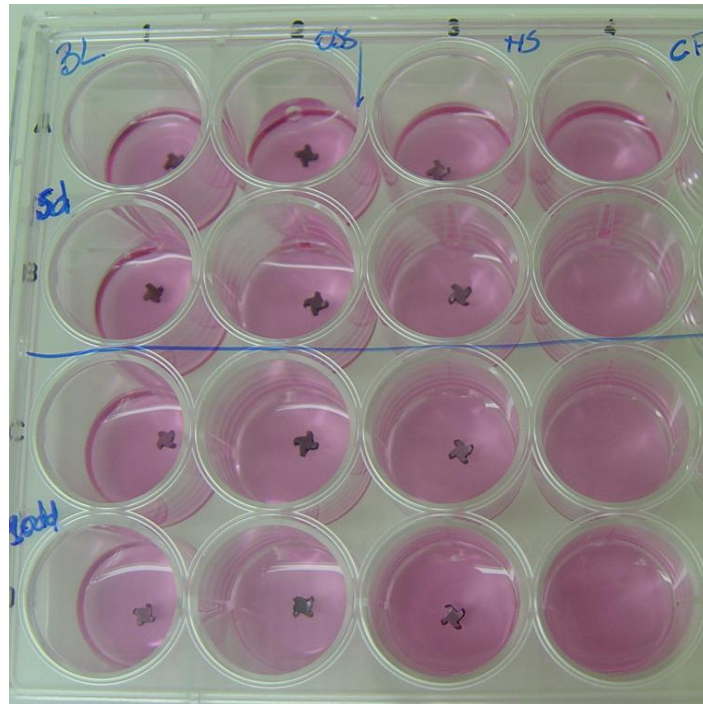


Figura 4: Discos de titânio cortados e colocados em meio de cultura.

4.3.3 Composição dos grupos experimentais:

Três grupos experimentais, cada um correspondente a um tipo de superfície de implantes comerciais de titânio: BL (Bonelike®), OS (Osseotite™) e NT (Nanotite™) em duplicata foram avaliados em dois períodos diferentes de cultura de células da medula óssea humana correspondendo a 14 e 21 dias. Para os mesmos períodos e para cada grupo, também em duplicata, foram colocadas as mesmas células em cultura, porém sem contato com nenhuma das superfícies de titânio estudadas. Estes poços de cultura compõem o grupo controle que servirá para comparar a expressão gênica das células dos grupos teste.

Tabela 1: Distribuição por grupos dos discos de titânio por unidades nos dias de cultura.

GRUPOS	DIAS DE CULTURA	
	14 dias	21 dias
Osseotite	2	2
Nanotite	2	2
Bonelike	2	2

4.4 Cultura de células da medula óssea sobre os discos de titânio

As células da medula óssea na concentração de 5×10^6 foram colocadas para cultivo em placas de cultura com 12 poços (500 μ L de suspensão celular por poço). Cada poço continha um disco de titânio e a placa de cultura foi mantida a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ em meio D-MEM suplementado por 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen, USA) inativado durante 30 min a 56°C contendo 1% de solução de penicilina-estreptomicina (10.000 g/ml, 10.000 μ g/ml, Invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina (100 mg/ml Invitrogen, USA).

4.5 Extração do Ácido Ribonucleico (RNA) total

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System, de acordo com as recomendações do fabricante. Tanto a qualidade quanto a quantidade do RNA total extraído foram analisados por espectrofotometria (A260/280) e por visualização em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo. As amostras foram tratadas com DNase I antes da síntese do cDNA.

4.6 Síntese do Ácido Deoxirribonucleico complementar (cDNA)

Foram usados 5 µg de RNA total para síntese do cDNA utilizando-se o kit RT² First Strand Kit (SABiosciences), conforme as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi tratado com RNase H com a finalidade de degradar todos e quaisquer mRNAs que serviram de molde para a síntese do cDNA, eliminando qualquer contaminação cruzada com o mRNA.

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

As análises pela QT-PCR foram realizadas utilizando o termociclador iCycler iQTM (BioRad Co.). Para reação da quantificação de marcadores de diferenciação óssea foi utilizado o kit RT² qPCR Master Mixes (SABiosciences), conforme as recomendações do fabricante, bem como os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para os genes de fosfatase alcalina (PPH01311-E-200, SABiosciences), osteocalcina (PPH01898-A-200, SABiosciences), osteopontina (PPH0582-E-200, SABiosciences) e β-actina (PPH00073-E-200, SABiosciences).

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

Para a mensuração, o valor do ciclo limiar (Ct), foi determinado pelo termociclador. Os valores de Ct dos genes de interesse, fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina foram normalizados para o gene *β-actina*. E os resultados foram analisados usando o método limiar crítico comparativo, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foram expressos em comparação com os valores obtidos para as células do grupo controle.

4.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células da medula óssea humana em cultura sobre superfícies de titânio:

A análise das culturas celulares em superfícies de titânio através de MEV foi realizada em um microscópio eletrônico da marca Philips, modelo XL 30 no Laboratório de Engenharia da PUCRS. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% e após desidratadas em banho de acetona seriado de 30% a 100%. Através do processo de *sputterin* as amostras tiveram sua superfície coberta por uma fina camada de ouro para permitir sua visualização no microscópio.

RESULTADOS:

5. Resultados

5.1 Expressão das proteínas fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina através de PCR em tempo real:

Nos resultados obtidos para a expressão da proteína fosfatase alcalina (ALP) observou-se que aos 14 dias de cultura os grupos OS e NT apresentaram 0,008 e 0,001 número de vezes maior em relação ao controle. O grupo BL não expressou ALP neste período. Aos 21 dias de cultura pode-se observar que houve um aumento da expressão da ALP nos três tipos de superfície de titânio. O grupo que apresentou os melhores resultados foi o BL com 1,46 número de vezes maior em relação ao controle, seguido do OS e do NT com 0,42 e 0,026 número de vezes maior do que controle respectivamente (Gráfico 1 e Tabela 1).

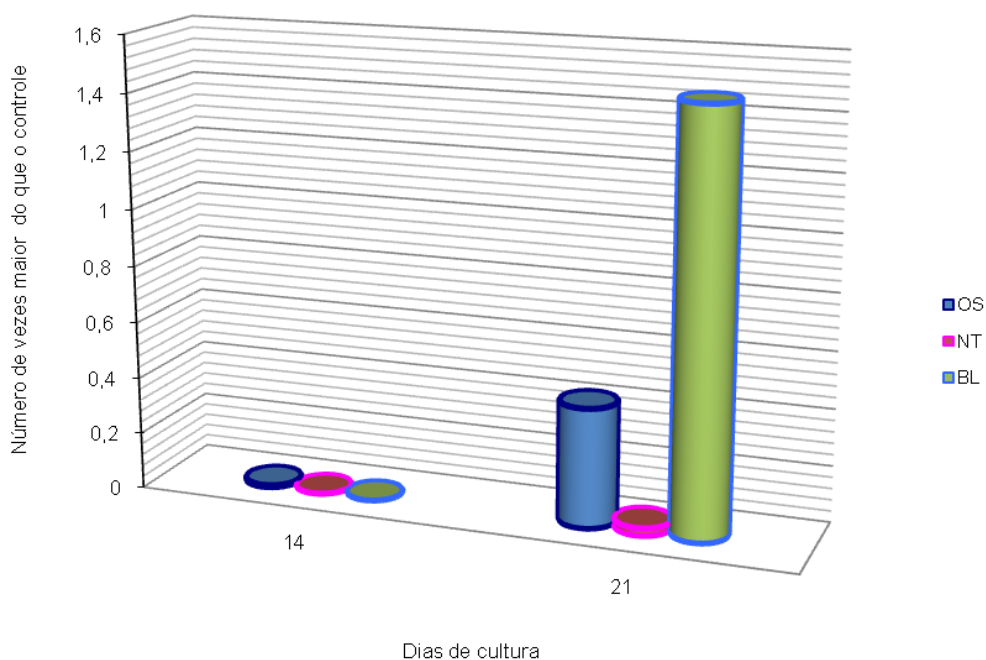


Gráfico 1: Expressão da Fosfatase Alcalina (ALP) nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio. OS= 0,008(14 dias) e 0,42 (21 dias); NT= 0,001 (14 dias) e 0,026 (21 dias); BL= 0(14 dias) e 1,46 (21 dias).

Tabela 2: Expressão da Fosfatase Alcalina nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio.

Grupo	Dias de Cultura	
	14	21
OS	0,008	0,42
NT	0,001	0,026
BL	0	1,46

Nos resultados obtidos para a expressão da Osteocalcina (BGLAP) o único grupo que expressou a proteína foi o NT com 0,108 número de vezes maior do que o controle aos 14 dias de cultura. Aos 21 dias de cultura nenhuma das superfícies permitiu a expressão de BGLAP.

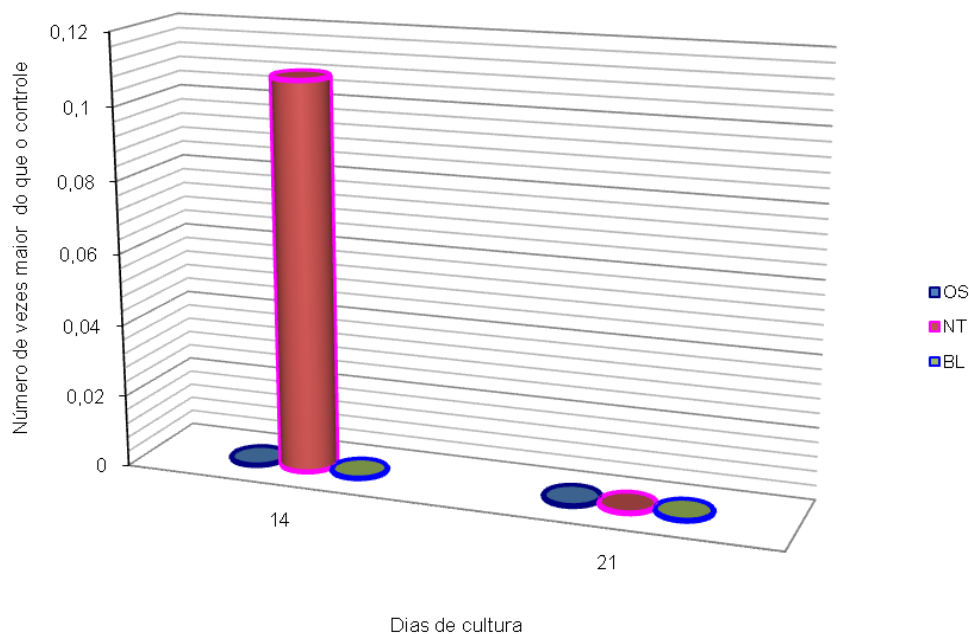


Gráfico 2: Expressão da Osteocalcina (BGLAP) nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio. OS= 0(14 dias e 21 dias); NT= 0,108 (14 dias) e 0 (21 dias); BL= 0(14 dias e 21 dias).

Tabela 3: Expressão da Osteoclastina nos períodos de 14 e 21 dias de cultura sobre superfícies de titânio.

Grupo	Dias de Cultura	
	14	21
OS	0	0
NT	0,108	0
BL	0	0

5.2 Avaliação de adesão e morfologia celular por MEV:

Pode-se observar na superfície dos implantes Bonelike a presença de células da medula óssea humana aos 14 e aos 21 dias de cultura em um número pequeno em relação aos outros grupos. Não foi possível visualizar uma diferenciação na morfologia celular nos períodos observados.

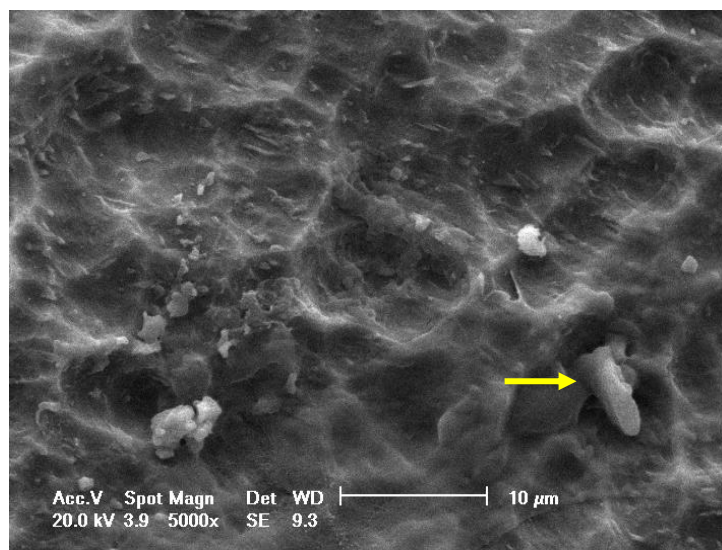


Figura 5: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Bonelike* aos 14 dias de cultura. Seta indica célula aderida à superfície.

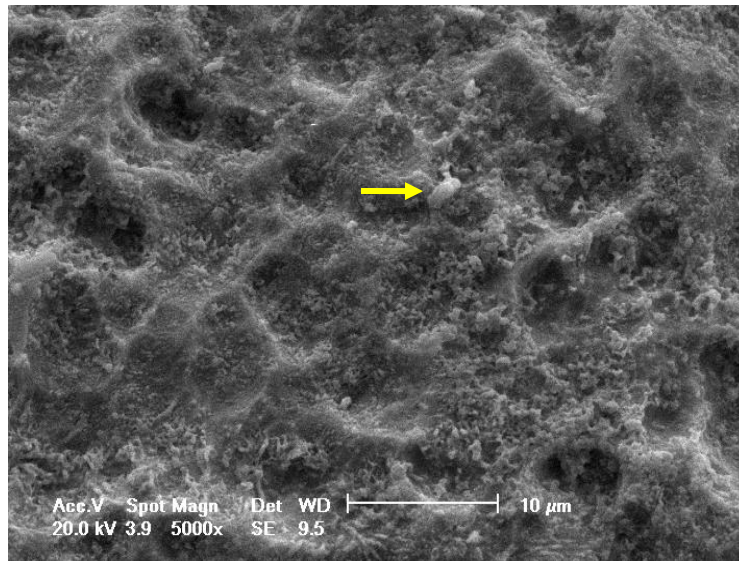


Figura 6: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Bonelike* em 21 dias de cultura. Seta indica célula aderida à superfície.

Nos resultados para o grupo OS, foi possível observar a presença de células aos 14 e aos 21 dias de cultura. Nos dois períodos de observação, pode-se perceber uma mudança na morfologia celular adquirindo características de osteoblastos e aderindo-se na superfície de titânio.

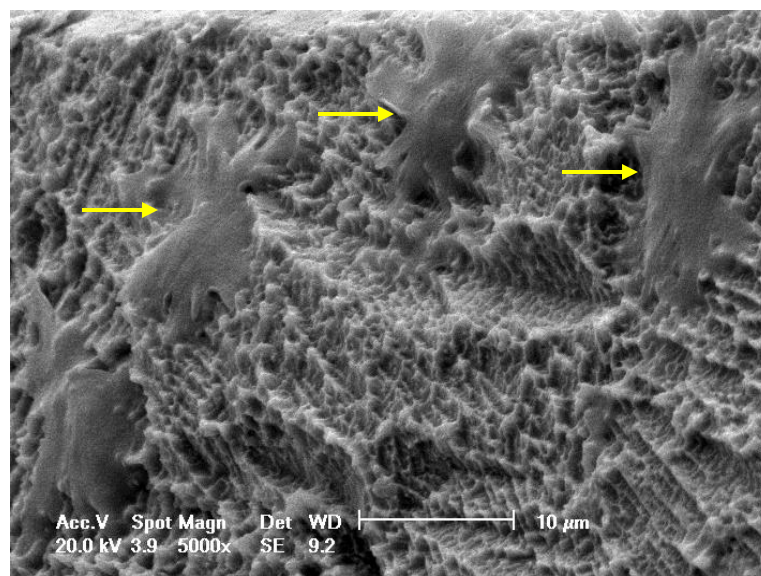


Figura 7: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Osseotite* em 14 dias de cultura. Seta indica célula aderida à superfície.

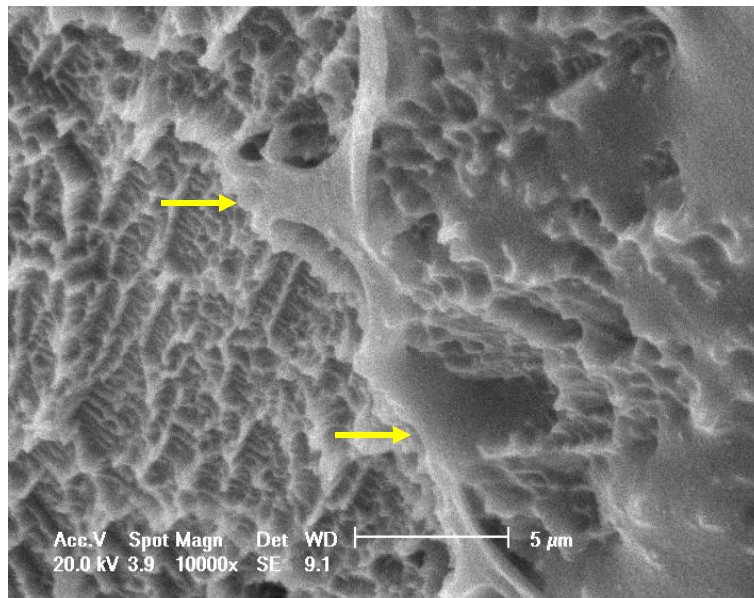


Figura 8: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Osseotite* em 21 dias de cultura. Seta indica célula aderida à superfície.

Em relação ao grupo NT pode-se perceber nas fotografias de MEV de 14 e 21 dias de cultura que há presença células. Não é possível perceber mudanças na morfologia celular.

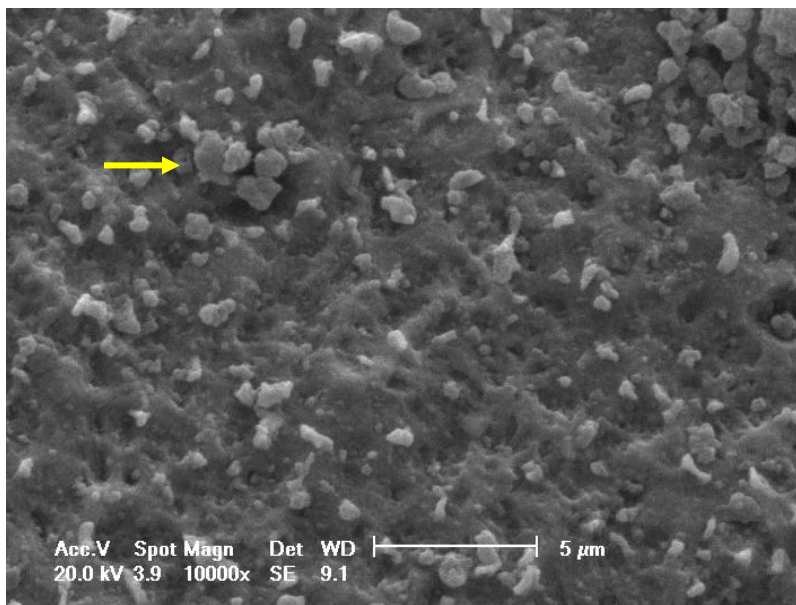


Figura 9: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Nanotite* em 14 dias de cultura. Seta indica célula aderida à superfície.

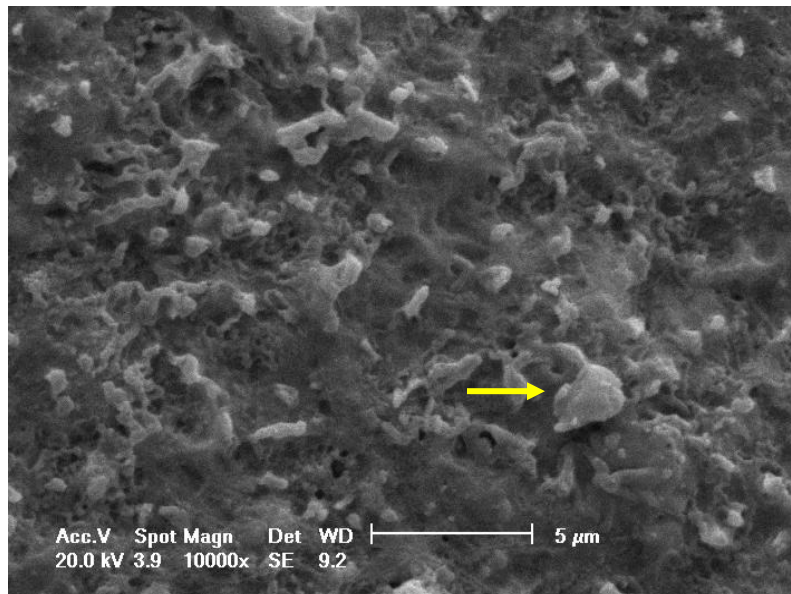


Figura 10: Fotomicrografia eletrônica de varredura da superfície do implante *Nanotite* em 21 dias de cultura. Seta indica célula aderida á superfície.

DISCUSSÃO:

6. Discussão

A compreensão do metabolismo e fisiologia óssea vem sendo pesquisado há décadas, no entanto há muito ainda a ser esclarecido.

Vários autores definiram os princípios básicos para as pesquisas com tecido ósseo e hoje as culturas de células ósseas é uma realidade em vários centros com diversos objetivos. (1,13,18,19)

A organização celular do tecido ósseo é de importante compreensão na área da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pois participa da consolidação de fraturas da reconstrução de defeitos ósseos e também da osseointegração dos implantes dentários. (9, 56, 64)

A evolução da aplicação dos implantes dentários nas reabilitações odontológicas tem apresentado resultados excelentes e a evolução destes materiais tem contado com um avanço tecnológico impressionante, tanto para o desenvolvimento de novas tecnologias como para as pesquisas básicas. (46,47)

A interação da superfície de titânio dos implantes dentários com o tecido ósseo durante o processo de osseointegração é uma das linhas de pesquisa mais atuais. A previsibilidade da osseointegração hoje leva ao desenvolvimento de novas superfícies que permitam um menor período de cicatrização implantar seguro e efetivo. (50,52)

A utilização de CMI da medula óssea humana já é uma realidade e sua manipulação é simples e pode ser aplicada em várias pesquisas e na clínica diária, ajudando muito na compreensão da fisiologia do tecido ósseo e no desenvolvimento de biomateriais. (24,28,54)

Neste estudo, buscou-se analisar diferentes tipos de superfícies de implantes caracterizadas por tratamentos semelhantes, contudo diferem quanto à presença ou não de nanopartículas de fosfato de cálcio. Como a literatura internacional vem demonstrando, este parece ser um ponto importante e controverso quanto a real influência destas partículas na capacidade de diferenciação celular e na osseointegração. (52,59,63)

Os diferentes resultados obtidos nesse estudo com relação aos diferentes tipos de superfície como o caso das Bonelike, Osseotite e Nanotite estão de acordo com o observado por Masaki et al (2005) que detectou padrões variáveis de expressão das proteínas osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina variam de acordo com a rugosidade e tratamento da superfície de titânio. (54)

No trabalho de Ong et al (1997) a expressão da fosfatase alcalina foi maior e da osteocalcina mais rápida nos discos de titânio rugoso do que nos discos de superfície polida. Os pesquisadores utilizaram BMP2 como estimulador da diferenciação celular e provavelmente por isso a expressão gênica de tais proteínas pode ser detectada. É importante salientar que esses autores também não detectaram a expressão de osteopontina, como ocorreu no presente estudo. (48)

Neste estudo optou-se por não utilizar fatores de diferenciação que pudessem interferir na diferenciação celular. Desta forma, somente a variável superfície dos implantes de titânio e seu efeito na diferenciação, adesão e proliferação celular foi investigada.

Ao se verificar que houve expressão de ALP nos três grupos e sendo eles todos de superfície rugosa embora com diferenças quanto a presença de nanopartículas de fosfato de cálcio percebe-se que o padrão de rugosidade da superfície do grupo BL parece interferir positivamente para maior expressão da mesma. Devido ao fato de que o grupo NT apresentou os piores resultados para

síntese de ALP, pode-se sugerir que a presença de fosfato de cálcio retarda ou inibe a síntese dessa proteína.

Alguns autores sugerem que a rugosidade da superfície de implantes retarda a manifestação de ALP e a superfície tratada (rugosa) torna mais rápida a manifestação de BGLAP. (48)

Nos resultados desta pesquisa o Grupo NT apresentou síntese de osteocalcina em 14 dias de cultura enquanto os outros grupos não. Pode-se avaliar que no caso da síntese da osteocalcina, as partículas de fosfato de cálcio provavelmente tenham sido responsáveis por esta diferença, uma vez que estavam presentes somente neste grupo.

A rugosidade das superfícies de biomateriais em culturas celulares pode promover um atraso na manifestação genética - incluindo a fosfatase alcalina - e na sua proliferação. Contudo, não há bloqueio da atividade celular. (65)

Nos achados do presente trabalho também se observou que a ALP apresentou um padrão crescente em todos os grupos sendo menor (ou de manifestação mais lenta) no grupo NT, média no OS e maior no BL. Sendo assim, provavelmente o fato de haver uma síntese menor de ALP não significa que houve bloqueio da atividade celular. É importante compreender que no meio de cultura celular deste estudo, não havia meios indutores como fatores de crescimento os BMPs. Assim, a atividade celular dependia exclusivamente da sua relação com a superfície de titânio.

O tratamento de superfícies de titânio é importante para a manifestação do fenótipo osteogênico, contudo os resultados de alguns estudos são melhores em relação à síntese protéica pela presença de BMP4 no meio. (58)

Este fator foi evitado na pesquisa atual para permitir apenas a interferência da rugosidade da superfície e da presença ou não de nanopartículas de fosfato de cálcio. Desta forma, mesmo com resultados menores do que a literatura pode-se observar que realmente as células da medula óssea humana parecem comprometer-se com o fenótipo osteogênico sem a necessidade de indução por outros fatores além da superfície de titânio.

Em estudos com arcabouços para cultura celular com e sem nanopartículas de fosfato de cálcio observou-se estas interferem positivamente na maior síntese de ALP e BGLAP. (63)

Novamente observa-se que a osteopontina não se manifestou como nesta pesquisa. Outro ponto no qual se concorda com a literatura é que a BGLAP provavelmente é mais sintetizada quando na presença de fosfato de cálcio. Resultados semelhantes foram observados quando superfícies de titânio com tratamento por jateamento de sílica e ataque ácido com ou sem cristais de hidroxiapatita foram comparados. (57)

Provavelmente não se observou a expressão de osteopontina pelo fato de que a indução celular é discreta em meios de cultura sem a presença de BMPs. Contudo, a presença de fosfato de cálcio induziu a síntese de BGLAP e isto provavelmente demonstra um maior potencial indutor deste tipo de superfície.

Desta forma, pode-se afirmar que os resultados obtidos estão de acordo com o esperado pela literatura e que mesmo havendo um padrão um pouco diferente em relação à fosfatase alcalina onde o grupo nanotite foi menor, embora não tenha deixado de sintetizá-la. Na presença de fosfato de cálcio é quando a síntese de osteocalcina atinge melhores resultados e por isso, provavelmente na sua presença, mesmo tendo retardada sua síntese de fosfatase alcalina a diferenciação celular parece ser mais efetiva.

A osteocalcina é uma proteína expressa em estágios mais tardios de osteogênese e, portanto, sua presença no grupo nanotite manifesta a presença de células num estágio mais avançado de diferenciação. Assim como em outros estudos, não foi manifestada a síntese de osteopontina. (66,67,68)

Embora para alguns autores a superfície NanoTite™ aumente as propriedades de osseointegração e cicatrização periimplantar. (10,59) Existem outros autores afirmam que não houve diferença na área de contato ósseo entre os implantes NanoTite™ e Osseotite™ em estudos com humanos e animais. (61,62).

Pelo fato da proliferação celular ser maior na superfície do grupo NT e pela morfologia celular estar mais diferenciada no grupo OS, pode-se sugerir que os resultados esperados para as respostas de tratamentos clínicos destes implantes em tecido ósseo sejam muito bons e permitam uma osseointegração mais rápida e efetiva. No entanto, provavelmente a presença de nanopartículas sugere melhores resultados de acordo com o que foi apresentado neste estudo.

É claro que os resultados clínicos destes tipos de implantes também irão variar de acordo com a técnica cirúrgica, condições do paciente e principalmente a qualidade do tecido ósseo como afirmam alguns autores. (62)

Sendo assim o presente estudo contribui no avanço e pesquisa de novas tecnologias para melhorar o padrão de osseointegração dos implantes dentários e também tem consciência de que os resultados deste tipo de pesquisa devem ser somados a outros que se seguem. Assim, poderemos compreender claramente o comportamento celular frente às novas modificações em superfícies de implantes osteointegráveis.

CONCLUSÃO:

7 Conclusão

O estudo *in vitro* da diferenciação osteogênica de cultura de células derivadas da medula óssea sobre diferentes superfícies de titânio possibilitou concluir que:

- As células da medula óssea aderem-se as superfícies pesquisadas;
- As células da medula óssea proliferam nas diferentes superfícies pesquisadas;
- A síntese de fosfatase alcalina é maior na superfície Bonelike;
- A presença de nanopartículas de fosfato de cálcio na estrutura dos implantes induz a síntese de Osteocalcina;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1991; 263: 30-48.
2. MARX RE, CARLSON ER, EICHSTAEDT RM, SCHIMMELE SR, STRAUSS JE, GEORGEFF KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85(6):638-46.
3. ANITUA E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4): 529-35.
4. MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2002; 395: 66-80.
5. LORO. Estudo in vitro da osteoindução de células da medula óssea humana. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 137p, Porto Alegre, 2002.
6. GOMI, K. et al. Bone marrow genesis after subcutaneous delivery of rat osteogenic cell-seeded biodegradable scaffolds into nude mice. *Journal of Biomedical Material Research*. n. 21. Oct. 2004.
7. GUAN, L., DAVIES, J. E., Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. *Journal of Biomedical Material Research*. n. 11. Oct. 2004.
8. DATTA, N. N., et al. Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2005; 26(9): 971-77.
9. DAVIES, J.E. Bone Engineering Workshop. 2000: Toronto, Canada
10. MENDES VC, DAVIES JE Discrete Calcium Phosphate Nanocrystals Render Titanium Surfaces Bone Bonding *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2007;22:484
11. ORSINI G, PIATTELLI M, SCARANO A, PETRONE G, PIATTELLI A, CAPUTI S Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontal* 2007; 78:209-218
12. GOENÉ RJ, TESTORI T, TRISI P. Influence Of A Nanometer-Scale Surface Enhancement On De Novo Bone Formation On Titanium Implants: A

- Histomorphometric Study In Human Maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007; 27:211–219
13. URIST, M. R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. M. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983; 220(4598): 680-86.
 14. GRAY, Colin; BOYDE, Alan; JONES, Sheila. The isolation, culture, and function assay of osteoclasts and osteoblasts. In: CELIS, Julio E. (Org.). *Cell biology: a laboratory handbook* 1994; 142-148.
 15. MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science* 2000; 113(7): 1161-66.
 16. FRITSCHER GN. Cultivo de células da medula óssea humana sobre membranas de colágeno bovino e arcabouços de ácido poliglicólico polilático (PLGA). *Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 118p, Porto Alegre, 2007.*
 17. RAMOSHEBI, L. N., et al. Tissue engineering: TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Experimental Reviews in Molecular Medicine.* 2002 ,Disponível em : <<http://www.expertreviews.org/02004969h.htm>>. Acesso em: 6 out. 2002.
 18. CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 1991; 9(5): 641-50.
 19. REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 1997; 8(1):11-20.
 20. SILVA T. Efeito da rugosidade de superfície de discos de titânio sobre a proliferação e diferenciação de células de medula óssea humana. *Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 112p, Porto Alegre, 2004.*
 21. SILVA JR. Análise in vitro da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de titânio e submetidas à irradiação com laser não-cirúrgico. *Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 128p, Porto Alegre, 2003.*
 22. PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, JAISWAL R K, DOUGLAS R, MOSCA J D et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 2008; 284(5411): 143-47.
 23. KREBSBACH, P. H., et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* 1999; 10(2):165-81.
 24. PETITE, H., et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology.* 2000; 18(9): 959-63.

25. AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochemistry and Cell Biology*. 1998; 76(6): 899-910.
26. TURGEMAN, G., et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*. 2001; 3(3): 240-51.
27. LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2001; 27(3): 677-90.
28. THALMEIER, K., et al. Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice. *Acta Haematologica*. 2001; 105(3): 159-65.
29. AUBIN, J. E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1999; 72(3): 396-410.
30. LURIA, E. A. et al. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell and Tissue Research*. 1987; 248(2): 449-54.
31. PULEO, D. A. Dependence of mesenchymal cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro. *Journal of Cellular Physiology*. 1997; 173(1): 93-101.
32. MALAVAL, L., et al. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1999; 74(4) : 616-27.
33. NAGAI, N., et al. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1999; 28(2): 143-50.
34. KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*. 2002; 8(3): 147-59.
35. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000; 21(7):667-81.
36. MURATA, M., et al. Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1998; 27(5): 391-96.
37. AUBIN, J. E. Bone stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*. 1998; 30; 73-82.
38. YAMAMOTO, N.; FURUYA, K.; HANADA, K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25(4): 509-15.
39. EINHORN, T. A. Enhancement of fracture-healing. *The Journal of Bone and*

- Joint Surgery American Volume.1995; 77(6): 940-56.
40. CHEN, D., et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcified Tissue International*. 1997; 60(3): 283-90.
 41. YOON, S. T.; BODEN, S. D. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002; 395:33-43
 42. OKUBO, Y., et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2000; 29(1):62-6.
 43. GERICKE A, QIN C, SPEVAK L, FUJIMOTO Y, BUTLER W T, SORENSEN E S et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biOMineralization. *Calcif Tissue Int*. 2005;77(1), 45-54.
 44. BECK G R JR, ZERLER B, MORAN E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15): 8352-7
 45. AKSU A E, Rubin P, Dudas J R, Marra K G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60(3):306-22.
 46. BRUNETTE DM. The effect of surface topography on cell migration and adhesion. In: Ratner BD ed. *Surface Characterization of Biomaterials*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers: 1988; 203-17.
 47. CHEROUDI B, MCDONNELL D, BRUNETTE DM. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res*. 1997; 34(3): 279-90.
 48. ONG JL, CARNES DL, CARDENAS HL, CAVIN R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent*. 1997;6(1):19-24.
 49. BOYAN BD, BATZER R, KIESWETTER K, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to $1\alpha, 25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$. *J Biomed Mater Res*. 1998; 39(1): 77-85.
 50. BOYAN BD, SCHWARTZ Z. Modulation of osteogenesis via implant surface design. 2000, Apud: Davies, J.E. *Bone Engineering Workshop*, 2000: Toronto, Canada
 51. RATNER B. New in biomaterials science: a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1993; 27: 837-50.

52. WIELAND M, HÄNGGI P, HOTZ W, TEXTOR M, KELLER BA, SPENCER ND. Wavelength-dependent measurement and evaluation of surface topographies: Application of a new concept of window roughness and surface transfer function. *Wear*. 2000; 237(2): 231-52.
53. HAYAKAWA T, YOSHINARI M, NEMOTO K, WOLKE JG, JANSEN JA. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(4):296-304
54. MASAKI C, SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D, STANFORD C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(6):650-6
55. SAADEH et al. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *Craniofacial Surgery*, 2001;12(6): 573-9.
56. BELTRÃO GC, DE ABREU AT, BELTRÃO RG, FINCO NF. Lateral cephalometric radiograph for the planning of maxillary implant reconstruction. *Dentomaxillofac Radiol*. 2007;36(1):45-50
57. WANG CY, ZHAO BH, AI HJ, WANG YW. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells grown on two different titanium implant surfaces. *Biomed Mater*. 2008;3(1):150-04.
58. SILVA TS, MACHADO DC, VIEZZER C, SILVA JÚNIOR AN, DE OLIVEIRA MG. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):200-5.
59. TELLEMAN G, ALBREKTSSON T, HOFFMAN M, JOHANSSON CB, VISSINK A, MEIJER HJ, RAGHOEBAR GM. Peri-Implant Endosseous Healing Properties of Dual Acid-Etched Mini-Implants with a Nanometer-Sized Deposition of CaP: A Histological and Histomorphometric Human Study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009;(23).
60. SCHLIEPHAKE H, AREF A, SCHARNWEBER D, RÖSLER S, SEWING A. Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: calcium phosphate coatings. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(1):38-44.
61. SCHWARZ ML, KOWARSCH M, ROSE S, BECKER K, LENZ T, JANI L. Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(3):667-78.
62. VIGNOLETTI F, JOHANSSON C, ALBREKTSSON T, DE SANCTIS M, SAN ROMAN F, SANZ M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. De novo bone formation. *J Clin Periodontol*. 2009;36(3):265-77.

63. YANG X, YANG F, WALBOOMERS XF, BIAN Z, FAN M, JANSEN JA.. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009 (25).
64. SADER MS, BALDUINO A, SOARES GDE A, BOROJEVIC R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Dec;16(6):667-75
65. FANBURG, J. C., et al. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 1997;108(4): 464-73.
66. DERKX, P., et al. Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone*,1998; 22(4): 367-73.
67. MEYER, U., et al. Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 1999; 27(4): 222-7

ANEXOS:



Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 30 de maio de 2005

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0024/05

Intitulado: *Análise da Regeneração Óssea em Ratos Através de Enxerto de Membrana de Colágeno Contendo Células Diferenciadas da Medula Óssea.*

do(a) aluno(a): *Rodrigo Gomes Beltrão*


Programa de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em *27 de maio de 2005*.


Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

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

--Termo de Consentimento--

Destino das células tronco coletadas junto ao paciente

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

Porto Alegre, setembro de 2009.

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