

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

**ROSANA KALAOUN**

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA  
ÓSSEA A UM ARCABOUÇO DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO**

Prof. Dr. Cláiton Heitz  
Orientador

Porto Alegre  
2014

---

ROSANA KALAOUN

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA  
ÓSSEA A UM ARCABOUÇO DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO**

Tese apresentada como requisito para obtenção de título de Doutor em Odontologia na área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Cláiton Heitz

Linha de Pesquisa: Biomateriais

Porto Alegre

2014

---

---

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

K14a Kalaoun, Rosana

Análise da associação de células mononucleares de medula óssea a um arcabouço de osso bovino liofilizado. — Porto Alegre, 2014.

81 f. : il.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, PUCRS, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Cláiton Heitz.

1. Odontologia. 2. Engenharia Tecidual. 3. Células-Tronco. 4. Regeneração Óssea. 5. Osso e Ossos. 6. Células da Medula Óssea. 7. Matriz Óssea. I. Heitz, Cláiton. II. Título.

CDD: 617.52

Alessandra Pinto Fagundes  
Bibliotecária  
CRB10/1244

---

---

---

ROSANA KALAOUN

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA  
ÓSSEA A UM ARCABOUÇO DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO**

Aprovada em: 26 de novembro de 2014.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr.: Cláiton Heitz (orientador)

---

Prof. Dr. Marcel Fasolo de Paris

---

Prof. Dr. Luis Eduardo Schneider

---

Prof. Dr. Raphael Carlos Drumond Loro

---

Prof. Dr. Guilherme Genehr Fritscher

---

Prof. Dr. Eduardo Martinelli de Lima (suplente)

Porto Alegre

2014

---

---

---

### **Dedicatória**

*Aos meus pais Amin e Amira, por toda dedicação, amor, carinho e pelos valores que me foram transmitidos. Ao meu amor Renato por compartilhar as minhas preocupações e ansiedades, pela compreensão, por todo apoio e incentivo, pela união e pelo companheirismo. Aos meus irmãos Hannah, Samir e Mona pelo estímulo ao meu crescimento pessoal e profissional.*

---

---

## AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Professor Alexandre Bahlis, Diretor da Faculdade de Odontologia, por me acolherem nesta casa, contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa da coordenadora, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Spohr.

À Capes pelo auxílio para o desenvolvimento deste estudo, contribuindo para o meu aprimoramento técnico-científico.

Ao orientador Prof. Dr. Cláiton Heitz – Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pela orientação constante durante todo o período de realização deste trabalho, pela consideração e pela amizade que fez com que pacientemente atendesse às minhas solicitações, com interesse, disponibilidade e atenção.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Cantarelli Machado – Coordenadora do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS pela disponibilização da utilização das dependências do laboratório, pela admirável dedicação à ciência, pela orientação constante e por todos os ensinamentos, pela receptividade e pela credibilidade.

Ao Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, pela confiança e pela oportunidade oferecida, pela colaboração e pelo incentivo profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Martha Campos e ao Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, obrigada por todo auxílio, ensinamentos e orientações para a qualificação deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Lourdes Maria Araújo Quaresma de Camargo – Gerente de Tecnologia e Responsável Técnica da Baumer S.A., não só pela disponibilização dos blocos de OrthoGen® para a realização da fase experimental do trabalho, mas pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela motivação a prosseguir mesmo diante das dificuldades encontradas para o desenvolvimento da fase experimental deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Galia – Médico do Grupo de Cirurgia do Quadril do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Professor da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Rio Grande do Sul. Responsável pelo desenvolvimento do protocolo de processamento e pela realização de estudos pioneiros para avaliar as características físico-químicas do enxerto ósseo bovino liofilizado (OrthoGen®, Baumer S.A.).

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Berenice Anina Dedavid – Coordenadora do Centro de Microscopia e Microanálise (CEMM) da PUCRS, pelos ensinamentos e treinamento oferecido para viabilizar a utilização dos equipamentos e a preparação das amostras para a obtenção de imagens via microscopia eletrônica de varredura.

---

---

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fátima Therezinha C. Rodrigues Guma - Diretora Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por viabilizar a utilização dos equipamentos e a preparação das amostras para a obtenção de imagens via microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers - Professor Adjunto do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos e por todo o auxílio para o desenvolvimento da fase experimental do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Feliz Duarte de Moraes - Professor Adjunto do Departamento de Estatística da PUCRS e da UFRGS, pelo auxílio no tratamento estatístico dos resultados deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS – Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira, Prof. Dr. Raphael Carlos Drumond Loro e Prof. Dr. Guilherme Genehr Fritscher, obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pelo apoio e estímulo profissional.

Ao funcionário Fágner Henrique Heldt do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, por todo o auxílio e colaboração, pela paciência e pela incansável ajuda na fase experimental do trabalho. Sua dedicação e persistência foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada pela paciência e pela prestatividade durante este período.

Ao doutorando do Programa de Pós Graduação em Medicina com área de concentração em Neurociências da PUCRS - Daniel Rodrigo Marinowic, pelos ensinamentos, pela motivação e pelo estímulo profissional.

Ao aluno Rafael dos Santos Mazzuca e aos demais estagiários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, por suas colaborações na fase experimental do trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS - Ana, Paulo, Davenir, Kleber, Vanessa e Gabriel, por estarem sempre dispostos a ajudar, com eficiência e atenção.

Aos funcionários do CEMM da PUCRS - Miriam e Wagner, pela ajuda no preparo e na obtenção das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários do CEM da UFRGS - Christiane Lopes e Carlos Eduardo Lima dos Santos, pela ajuda no preparo e na obtenção das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários da Baumer S.A., em especial Maria Isabel Souza Campos e Rodrigo Gomes, por todo empenho no preparo e no fornecimento das amostras do OrthoGen®, de forma muito atenciosa e cuidadosa. Muito obrigada pela compreensão e por atender pacientemente às minhas solicitações.

---

---

Os meus agradecimentos especiais ao colega Alessandro Menna Alves, acadêmico de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS, na área de Patologia Bucal. A sua ajuda e foi fundamental para a realização da fase experimental do trabalho.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS. Obrigada por compartilharem as preocupações e ansiedades de cada etapa do curso, pelo convívio, pela troca de conhecimentos, companheirismo e motivação nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigada!

---

---

## RESUMO

### ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA A UM ARCABOUÇO DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO

As células-tronco mesenquimais detêm grande promessa para a reparação e regeneração de tecidos, inclusive de defeitos ósseos. A associação destas células a um arcabouço que se assemelhe à estrutura e à fisiologia do tecido ósseo é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea. O osso bovino liofilizado, com estrutura e composição química similares ao osso humano medular, além de possuir propriedades mecânicas comparáveis às do osso humano, atua como excelente material osteocondutor. O presente estudo *in vitro* teve como objetivos avaliar o cultivo de células mononucleares de medula óssea (CMMO) sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A., BR) recoberto com fibronectina; verificar se diferentes densidades celulares interferem na proliferação e na adesão destas células e avaliar se a associação de plasma rico em plaquetas (PRP) interfere na adesão e na proliferação das CMMO cultivadas sobre o arcabouço de osso bovino liofilizado. Para isso, células da medula óssea obtidas de um rato Kyoto foram cultivadas sobre blocos de osso bovino liofilizado, recobertos com fibronectina, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. As amostras do OrthoGen® foram distribuídas em quatro grupos experimentais, em triplicata, em três placas de cultura com 24 poços e avaliadas em três períodos: 72 h, 96 h e 192 h. Grupo 1: osso bovino liofilizado + CMMO ( $5 \times 10^4$  células/poço); Grupo 2: osso bovino liofilizado + CMMO + PRP; Grupo 3: osso bovino liofilizado + fibroblastos (3T3); Grupo 4: osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$  células/poço). As culturas foram incubadas com o agente intercalante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para coloração nuclear visando à avaliação de densidade populacional, por meio da detecção por microscopia confocal, do número de células aderidas aos arcabouços de osso bovino liofilizado, após 72 h, 96 h e 192 h. A análise da superfície do osso bovino liofilizado e das características morfológicas das células aderidas sobre ele o foram realizadas em uma amostra de cada grupo, com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura. A análise de variância (ANOVA) com dois fatores mostrou interação significativa entre os efeitos principais avaliados: grupo e tempo, com valor de  $p < 0,001$ . Através dos resultados do teste estatístico de Bonferroni, verificou-se diferença significativa da média de núcleos no período de

---

---

cultura de 96 h no grupo 3, e no período de cultura de 192 h no grupo 4, a qual foi maior do que as dos demais grupos. Através da análise por microscopia eletrônica de varredura foram observadas CMMO aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado somente no grupo 3 e no grupo 4, neste aumentando de forma progressiva, já sendo possível evidenciar diferenciação na morfologia celular e identificar células esféricas e fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos. Conclui-se que as CMMO cultivadas sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado recoberto com fibronectina aderiram e proliferaram sobre a superfície óssea. As CMMO cultivadas numa densidade de  $15 \times 10^4$  células / poço, aderiram e proliferaram sobre a superfície óssea de forma mais evidente, quando comparadas às CMMO cultivadas numa densidade  $5 \times 10^4$  células / poço, nos três períodos de cultura avaliados. A associação de PRP à cultura de CMMO sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado aumentou, mas não de forma estatisticamente significativa, a adesão e a proliferação celular sobre a superfície óssea.

**Palavras-chave:** Células da Medula Óssea; Células-Tronco; Matriz Óssea; Regeneração Óssea; Engenharia Tecidual

---

---

## ABSTRACT

### ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS TO A LYOPHILIZED BOVINE BONE SCAFFOLD

Mesenchymal stem cells hold great promise for tissues repair and regeneration, including bone defects. The association of these cells to a scaffold which resembles bone tissue structure and physiology is a major challenge in bone tissue engineering. The lyophilized bovine bone has a structure, chemical composition and mechanical properties similar to human bone marrow and acts as an excellent osteoconductive material. This *in vitro* study aimed to evaluate the growth of bone marrow mononuclear cells (BMMC) on a lyophilized bovine bone scaffold (Orthogen® - Baumer S.A., BR) covered with fibronectin; to verify if different cell densities interfere with the adhesion and proliferation of these cells and to evaluate whether the combination of platelet-rich plasma (PRP) interferes with adhesion and proliferation of BMMC grown on the lyophilized bovine bone scaffold. For this purpose, bone marrow cells obtained from a Kyoto rat were grown on blocks of lyophilized bovine bone coated with fibronectin in DMEM culture medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum. The Orthogen® samples were distributed into four experimental groups, in triplicate, in three 24 wells culture plates and evaluated in three periods: 72 h, 96 h and 192 h. Group 1: lyophilized bovine bone + BMMC ( $5 \times 10^4$  cells / well); Group 2: lyophilized bovine bone + BMMC + PRP; Group 3: lyophilized bovine bone + fibroblasts (3T3); Group 4: lyophilized bovine bone + BMMC ( $15 \times 10^4$  cells / well). Cultures were incubated with the intercalating agent 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining in order to evaluate the cell population density, by detection with confocal microscopy, of the number of cells adhered to the lyophilized bovine bone scaffolds, after 72 h, 96 h and 192 h. The analysis of the lyophilized bovine bone surface and the morphological aspects of the cells adhered to it was performed on one sample from each group, by scanning electron microscopy (SEM). Analysis of variance (ANOVA) with two factors showed a significant interaction between the main effects evaluated: group and time, with  $p < 0.001$ . Through the results of Bonferroni statistical test, significant difference was found in the average number of nuclei in the period of culture of 96 h in group 3, and the period of culture of 192 h in group 4, which was higher than the other groups. Through SEM analysis, mononuclear cells adhered to the lyophilized bovine bone

---

---

scaffold were observed only in the groups 3 and 4, in the last, progressively, being already possible to observe cell morphology differentiation and to identify spherical and fusiform cells with cytoplasmic extensions. We concluded that BMMC cultured on a lyophilized bovine bone scaffold coated with fibronectin adhered and proliferated on the bone surface. BMMC cultured at a density of  $15 \times 10^4$  cells / well, adhered and proliferated on the bone surface more evidently, when compared to the BMMC cultured at a density  $5 \times 10^4$  cells / well, in the three culture periods evaluated. The association of PRP to BMMC culture on a lyophilized bovine bone scaffold increased, but not with statistical significance, the adhesion and proliferation on the bone surface.

**Key-words:** Bone Marrow Cells; Stem Cells; Bone Matrix; Bone Regeneration; Tissue Engineering

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

**°C** - Graus centígrados

**%** - Por cento

**"** - Polegada

**®** - Marca registrada

**BMMC** - Bone Marrow Mononuclear Cells

**BMPs** - Proteínas Morfogenéticas Ósseas

**BR** - Brasil

**Ca** - Cálcio

**CA** - Califórnia

**CCEFO** - Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**cm<sup>3</sup>** - Centímetros cúbicos

**CME** - Centro de Microscopia Eletrônica

**CMIs** - Células Mesenquimais Indiferenciadas

**CMMO** - Células Mononucleares da Medula Óssea

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono

**COBEA** - Conselho Brasileiro de Experimentação Animal

**DAG** - Dexametasona / Ácido ascórbico/ β-Glicerolfosfato

**DAPI** - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

**DMEM** - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês: Dulbecos's modified Eagle Medium)

**dp** - Desvio padrão

**EDS** - Espectroscopia de Energia Dispersiva

**EP** - Erro Padrão

**EUA** - Estados Unidos da América

**FBS** - Soro Fetal Bovino

**FEPPS** - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

**FN** – Fibronectina

**g** - Força gravitacional

**G** - Gauge (calibre)

**h** - Hora

---

---

**H<sub>2</sub>O** - Água

**kW** - Quilowatt

**M** - Massa molar

**min** - Minuto

**mL** - Mililitro

**mm** - Milímetro

**NIH** - National Institute of Health

**P** - Fósforo

**P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>** - Pentóxido de Fósforo

**PBS** - Tampão Fosfato Salino (*do inglês: Phosphate Buffered Saline*)

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**PLA** - Ácido Poli-Láctico

**PLGA** - Ácido Poli- Láctico-Glicólico

**PPP** - Plasma Pobre em Plaquetas

**PRP** - Plasma Rico em Plaquetas

**PUCRS** - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**rhBMP** - Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana

**rpm** - Rotações por minuto

**RPMI** - Roswell Park Memorial Institute

**S.A** - Sociedade Anônima

**U** - Unidade

**U.I.** - Unidade Internacional

**UE** - Unidade de Endotoxina

**UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**USA** - United States of América

**β-TCP** - Beta-Fosfato-Tricálcico

**μg** - Micrograma

**μL** - Microlitro

**μm** - Micrômetro

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Enxerto ósseo bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A.).....	44
<b>Figura 2.</b>	Osso bovino liofilizado - OrthoGen®. Conforme preparado pela Baumer S.A. para a confecção de blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura. ....	44
<b>Figura 3.</b>	Preparo das amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® em capela de fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS..	45
<b>Figura 4.</b>	Amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - recortadas em blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura em meio DMEM.....	45
<b>Figura 5.</b>	Amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - sendo colocadas em placa de cultura de 24 poços.....	46
<b>Figura 6.</b>	Disposição das amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - na placa de cultura de 24 poços para ser realizada a aplicação de fibronectina.....	46
<b>Figura 7.</b>	Células mononucleares da medula óssea (seta) após centrifugação em gradiente de Histopaque® .....	47
<b>Figura 8.</b>	A. Preparo das suspensões contendo CMMO e meio DMEM. B. Distribuição das suspensões sobre os blocos de osso bovino liofilizado - OrthoGen® nas três placas de cultura de 24 poços.....	49
<b>Figura 9.</b>	Esquema representativo da disposição das amostras nos poços da placa de cultura. ....	49
<b>Figura 10.</b>	Fotomicrografia de células coradas com DAPI - 100 x.....	51
<b>Figura 11.</b>	Ilustração do método empregado para quantificação dos núcleos corados pelo DAPI usando o software PhotoScape e a ferramenta Paint Brush.....	51
<b>Figura 12.</b>	A. Amostras de osso bovino liofilizado - OrthoGen® montadas nos suportes metálicos. B. Amostras após sofrerem a metalização com ouro e carbono. ....	52
<b>Figura 13.</b>	Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 72 h). ....	53
<b>Figura 14.</b>	Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 96 h). ....	53
<b>Figura 15.</b>	Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 192 h). ....	53
<b>Figura 16.</b>	Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 72 h). ....	54

---

---

<b>Figura 17.</b> Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 96 h).....	54
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 192 h).....	54
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografia de fibroblastos <i>NIH 3T3</i> aderidos ao osso bovino liofilizado, corados com DAPI - 100 x (Grupo 3, 72 h).....	55
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografia de fibroblastos <i>NIH 3T3</i> aderidos ao osso bovino liofilizado, corados com DAPI - 100 x (Grupo 3, 96 h).....	55
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografia de células de fibroblastos <i>NIH 3T3</i> aderidos ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 3, 192 h).....	55
<b>Figura 22.</b> Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 72 h).....	56
<b>Figura 23.</b> Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 96 h).....	56
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 192 h).....	56
<b>Figura 25.</b> Resultados da comparação do número médio de células aderidas ao osso bovino liofilizado de cada grupo, nos diferentes períodos de cultura, de acordo com o Teste de Bonferroni. ....	59
<b>Figura 26.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO, nos aumentos de 50 x e 250 x (Grupo 1, 96 h).....	60
<b>Figura 27.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + fibroblastos <i>NIH 3T3</i> , nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 3, 72 h).....	61
<b>Figura 28.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + fibroblastos <i>NIH 3T3</i> , nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 3, 96 h).....	62
<b>Figura 29.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 72 h).....	63
<b>Figura 30.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 96 h).....	64
<b>Figura 31.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 192 h).....	65
<b>Figura 32.</b> Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), no aumento de 1000 x, evidenciando as células esféricas e fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos aderidas à superfície óssea (Grupo 4, 192 h).....	66

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados da composição orgânica das amostras de osso humano e bovino liofilizados .....	34
<b>Tabela 2.</b> Resultados da composição mineral das amostras de osso humano e bovino liofilizados .....	35
<b>Tabela 3.</b> Resultados da Análise de Variância para a quantificação do número de núcleos. ....	57
<b>Tabela 4.</b> Resultados da comparação do número de células aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado de cada grupo, nos diferentes períodos de cultura, de acordo com o Teste de Bonferroni.....	58

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA .....	23
3.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS .....	24
3.3 ARCABOUÇO .....	25
3.4 ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA.....	27
3.4 ENXERTO ÓSSEO BOVINO LIOFILIZADO .....	33
3.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS .....	37
3.6 FIBRONECTINA.....	40
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
4.1 ASPECTOS BIOÉTICOS .....	42
4.2 ANIMAIS .....	42
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.4 MEIO DE CULTIVO CELULAR .....	43
4.5 OBTENÇÃO DO OSSO BOVINO LIOFILIZADO.....	43
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO .....	44
4.7 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR.....	46
4.8 PREPARO DOS CONCENTRADOS DE PRP .....	47
4.9 PREPARO DOS FIBROBLASTOS.....	48
4.10 PREPARO DAS PLACAS .....	48
4.11 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A COLORAÇÃO PELO DAPI.....	50
4.12 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE POPULACIONAL .....	50
4.13 PREPARO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	51
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE POPULACIONAL .....	53

---

---

5.1.1 Comparação entre os grupos nos diferentes períodos de tempo de cultura .....	57
5.1.2 Comparações entre os grupos nos diferentes períodos de tempo de cultura conforme teste de bonferroni.....	58
5.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	60
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>78</b>
ANEXO A - APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA.....	79
ANEXO B - APROVAÇÃO CEUA.....	80
ANEXO C - TESTE DE REPLICABILIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO NUCLEAR DAS AMOSTRAS.....	81

---

## **1 INTRODUÇÃO**

O osso autógeno é considerado o enxerto ideal para o reparo de defeitos ósseos devido à sua capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora. No entanto, a necessidade de se ter uma área doadora e a morbidade cirúrgica associada à sua remoção tem sido um limitador da indicação e aceitação pelos pacientes deste tipo de enxerto.

A utilização de enxertos homólogos é uma alternativa para o reparo de defeitos ósseos por possuírem boa capacidade osteocondutora e terem disponibilidade menos limitada. Embora haja desvantagens no uso desses enxertos como a pouca osteogenicidade, baixa osteoindução, maior taxa de reabsorção, menor capacidade de incorporação ao hospedeiro, um potencial de gerar respostas imunológicas no receptor e o risco de transmissão de doenças, outros substitutos biológicos e sintéticos não se mostraram superiores. Por isso seu uso tem aumentado nos últimos anos de acordo com as estimativas da Associação Brasileira de Transplantes. Apesar do crescimento contínuo dos transplantes ósseos nos últimos anos, os Bancos de Tecidos Músculo-Esqueléticos no nosso país ainda lidam com dificuldades em captar, processar, armazenar e distribuir estes tecidos dentro de processo rigoroso e normatizado pelo Sistema Nacional de Transplantes - Ministério da Saúde. A demanda atual por enxertos ósseos homólogos congelados é muito maior que a quantidade disponibilizada e há necessidade da busca de novas fontes de tecido ósseo e do desenvolvimento de estratégias para resolver esta questão<sup>1</sup>. Visando o conforto e o mínimo de morbidade aos pacientes, buscamos repostas por meio da terapia celular, que utiliza os benefícios das células-tronco, para incrementar os substitutos ósseos alógenos, xenógenos e sintéticos, transformando um material primariamente osteocondutor, em um substituto ósseo com todas as propriedades e qualidades do enxerto ósseo autógeno, sem a morbidade e as complicações cirúrgicas associadas à sua obtenção.

---

As células-tronco adultas ou somáticas detêm grande promessa para a reparação e regeneração de tecidos, inclusive de defeitos ósseos. Atualmente, o interesse dos cientistas é contínuo na investigação da biologia das células-tronco mesenquimais, sobretudo quanto ao potencial de aplicações terapêuticas<sup>2</sup>.

As células mesenquimais têm sido descritas como células multipotentes que podem se multiplicar como células indiferenciadas e se diferenciar em células de linhagens de diferentes tecidos. A medula óssea de indivíduos adultos contém células-tronco mesenquimais indiferenciadas com um grande potencial osteogênico, que contribuem para a regeneração do tecido ósseo. As células da fração mononuclear correspondem à primeira separação das células-tronco e podem ser obtidas por meio de técnicas simples de centrifugação. Dentre as células mononucleares, existem as hematopoiéticas e as mesenquimais<sup>3-5</sup>.

Nos últimos anos, os estudos da associação de células mononucleares da medula óssea (CMMO) a diversos biomateriais têm evoluído progressivamente, visando melhorar a capacidade reparadora dos diferentes tipos de tecidos<sup>5-8</sup>.

A bioengenharia tecidual possibilita a utilização de células isoladas, fatores de crescimento que induzem a proliferação celular e substratos adequados que agem como carreadores de células ou proteínas, objetivando criar tecidos autógenos em laboratório e possibilitar sua aplicação como agentes terapêuticos. A associação de células-tronco adultas induzidas para diferenciação osteogênica a um arcabouço que se assemelhe o mais próximo à estrutura e à fisiologia do tecido ósseo é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea<sup>9</sup>.

Substitutos ósseos alógenos, xenógenos e sintéticos vem sendo utilizados de maneira crescente nas reconstruções ósseas, como alternativa aos enxertos autógenos, servindo como arcabouço ou suporte para o processo de neoformação óssea (osteocondutores). Pesquisadores das diferentes áreas de regeneração óssea buscam incrementar esses enxertos ósseos com células viáveis e fatores de crescimento, atribuindo a eles propriedades osteogênicas e osteoindutoras, características inerentes ao osso autógeno.

Diversos biomateriais vem sendo estudados para serem utilizados como arcabouços para transplantes celulares, visando à reparação óssea. Um bom arcabouço produzido pela bioengenharia deve possuir a morfologia semelhante a do

---

osso perdido, apresentar uma arquitetura interna que permita uma boa perfusão, adesão, proliferação, crescimento e maturação das células. Este material deve ser altamente hidratado para manter o ambiente isosmótico, permitir a mobilidade e o crescimento de elementos angiogênicos, apresentar baixo nível de imunogenicidade, ser de fácil adaptação e ter a capacidade de ser fixado cirurgicamente com parafusos ou fios. Além disto, deve ser uma barreira aos tecidos vizinhos e ser absorvido em um tempo compatível com a formação óssea<sup>5,7,10-12</sup>.

O osso esponjoso xenógeno de origem bovina com estrutura e composição química comparável ao osso humano é uma alternativa para atender a alta demanda de pacientes com necessidade de enxertos. O processo de fabricação do enxerto ósseo bovino liofilizado mantém a estrutura morfológica e química natural do osso, permitindo a produção de um produto final com excelentes características biomecânicas. Os ensaios pré-clínicos demonstraram excelente biocompatibilidade, capacidade de neoformação óssea e resistência mecânica do produto. O procedimento de limpeza dos espaços intertrabeculares otimiza os fenômenos de osteocondução acarretando a revascularização do enxerto. A preservação da estrutura química (mineral-colagenosa) e física (porosa trabeculada) natural do osso favorece a deposição e população de células com potencial osteogênico e formação de osso novo<sup>13</sup>.

A necessidade de desenvolver alternativas para o reparo de tecidos lesados tem dado destaque à implementação de materiais biomiméticos. Estes são capazes de induzir uma resposta celular específica e direcionar a formação do novo tecido via reconhecimento biomolecular. A modificação de superfícies tem sido proposta a fim de melhorar os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celular nas superfícies de biomateriais. O método de imobilização de biomoléculas da matriz extracelular, como a fibronectina, tem sido utilizado na produção de materiais bioativos<sup>14</sup>.

O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido utilizado associado aos enxertos ósseos visando acelerar e melhorar a qualidade da regeneração óssea. Promove uma maior adesão celular e acelera a proliferação celular e a diferenciação osteogênica devido à quantidade acentuada de fatores crescimento nele presentes<sup>15</sup>.

---

## *Introdução*

---

A ação conjunta dos fatores de crescimento derivados das plaquetas resulta na sinalização para que células mesenquimais e epiteliais migrem para o local lesado, sofram divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno, resultando assim, em uma cicatrização mais rápida e eficiente e favorecendo o processo de neoformação óssea<sup>15</sup>.

O presente trabalho constitui um estudo experimental *in vitro* que se propõe a realizar a análise da cultura de células mononucleares derivadas da medula óssea de rato Kyoto, associadas ou não a PRP, sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado recoberto com fibronectina.

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o cultivo de CMMO sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado (OrthoGen®- Baumer S.A., BR) recoberto com fibronectina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se diferentes densidades celulares interferem na adesão e na proliferação de CMMO cultivadas sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado.
  - Avaliar se a associação de PRP interfere na adesão e na proliferação das CMMO cultivadas sobre o arcabouço de osso bovino liofilizado.
-

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

A regeneração do tecido ósseo danificado está relacionada aos seguintes princípios biológicos fundamentais: osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção. Esforços têm sido feitos para atingir a forma ideal de regeneração óssea através da combinação destas quatro propriedades nos diversos tipos biomateriais<sup>15-17</sup>.

A osteogênese é considerada o processo mais eficaz de regeneração óssea. Ocorre quando células ósseas vivas são enxertadas em um leito receptor e permanecem com a capacidade de formação de novo tecido ósseo. A formação e o desenvolvimento de tecido ósseo ocorrem através do transplante autólogo de células ósseas, sendo necessário uma área doadora, distante ou não da área a ser enxertada. Esse tipo de terapia fornece desde células osteoblásticas bem diferenciadas até células mesenquimais indiferenciadas (CMI). O osso autólogo é o único biomaterial disponível com propriedade osteogênica. A sua forma mais eficaz é o osso esponjoso, que contém a maior concentração de células ósseas<sup>15,17,18</sup>.

A osteoindução representa a capacidade de um material de formar osso em local onde não haveria formação óssea através da indução de células-tronco mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos. As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e a matriz óssea desmineralizada são exemplos de agentes osteoindutores<sup>15,17,18</sup>.

A osteocondução é a propriedade apresentada pelos biomateriais de conduzir a neoformação óssea através de sua matriz de suporte (arcabouço), permitindo a migração de vasos e de células osteoprogenitoras provenientes da área receptora, além de impedir a migração de epitélio para o interior do defeito ósseo e desta forma, contribuir para a neoformação óssea. A matriz deve ser reabsorvida e simultaneamente substituída por tecido ósseo. Assim, os materiais osteocondutores

---

são biocompatíveis e formam um arcabouço para deposição e proliferação celular com atividade osteoblástica. Entre os materiais podemos incluir a hidroxiapatita, sulfato de cálcio, fosfato tricálcico e colágeno<sup>15,17,18</sup>.

A osteopromoção ocorre quando um material é adicionado ao leito receptor e sua presença exerce uma influência positiva sobre a regeneração óssea, quando em conjunto com outros fatores. Um exemplo seria o plasma rico em plaquetas, que através de seus fatores de crescimento liberados no processo de cicatrização contribui para a diferenciação e multiplicação celular, porém a sua simples presença, sem fatores osteogênicos ou osteocondutores, não propicia a formação óssea. Refere-se também ao uso de meios físicos (membranas ou barreiras) com o intuito de impedir a migração de células indesejáveis oriundas dos tecidos conjuntivo e epitelial, permitindo a diferenciação e proliferação celular, predominantemente de osteoblastos, a partir do leito receptor, viabilizando a neoformação óssea. A regeneração óssea guiada é a técnica que usa a osteopromoção como princípio biológico<sup>15,17,18</sup>.

As abordagens atuais em reconstrução óssea incluem cirurgias com biomateriais, enxertos autógenos ou alógenos e xenógenos, embora existam restrições em todas essas técnicas. Dentre estas restrições, a morbidade da área doadora, a limitação de quantidade dos auto-enxertos, riscos de respostas imunológicas e de transmissão de doenças infecciosas para aloenxertos. Numerosos substitutos ósseos têm sido utilizados nos últimos anos na prática clínica, no entanto, cada material tem desvantagens específicas, e nenhum deles pode perfeitamente substituir o auto-enxerto. Uma importante razão para priorizar os enxertos de tecido sobre os biomateriais é que eles contêm células viáveis e substâncias capazes de induzir a formação de tecidos, restaurando e mantendo as funções teciduais<sup>10,11,15,17,18</sup>.

### 3.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS

As células mesenquimais têm sido descritas como células progenitoras multipotentes que podem se replicar como células indiferenciadas e apresentam ainda a capacidade de se diferenciar em células da linhagem mesenquimal, como osso, cartilagem, ligamento, tendão, tecido conjuntivo, gordura e músculo. A

---

multiplicação e diferenciação destas células são reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais são responsáveis pelo controle da expressão dos padrões molecular e celular, resultando em tecidos específicos, com funções específicas, de acordo com o seu fenótipo<sup>3,4</sup>.

A medula óssea de indivíduos adultos contém células-tronco mesenquimais indiferenciadas com um grande potencial osteogênico, que contribuem para a regeneração do tecido ósseo. Esse processo de diferenciação é influenciado por nutrientes basais, densidade celular, organização espacial, forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas<sup>4</sup>.

No aspirado obtido de células da medula óssea existem células mononucleares (indiferenciadas) e multinucleares (já diferenciadas). Dentre as células mononucleares, existem as hematopoiéticas e as mesenquimais. As células da fração mononuclear correspondem à primeira separação das células-tronco e podem ser obtidas por meio de técnicas simples de centrifugação. As células hematopoiéticas dão origem a todos os tipos de células do sangue e as células mesenquimais têm o potencial de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido, se diferenciando em adipócitos, condrócitos, e precursores osteogênicos. O isolamento das CMLs é baseado no gradiente de densidade na centrifugação, o fenótipo das células permanece estável durante a cultura e não existe perda do potencial osteogênico, condrogênico e adipogênico<sup>5</sup>.

Nos últimos anos, os estudos da associação de CMMO a diversos biomateriais têm evoluído progressivamente, visando melhorar a capacidade reparadora dos diferentes tipos de tecidos<sup>6-8</sup>.

### 3.3 ARCABOUÇO

Arcabouços podem ser definidos com matrizes provisórias para o crescimento ósseo, proporcionando um ambiente apropriado para o desenvolvimento do tecido e favorecendo a adesão, o crescimento e a diferenciação celular<sup>12,19</sup>.

Diversos biomateriais vem sendo estudados para serem utilizados como arcabouços para transplantes celulares, visando à reparação óssea. Um arcabouço ideal para a engenharia óssea deve apresentar algumas características

---

fundamentais: biocompatibilidade, propriedades osteocondutora e osteoindutora; possuir uma arquitetura que permita uma boa perfusão e penetração celular (porosidade e interconectividade), composição química e propriedades mecânicas semelhantes às do osso perdido e características de superfície que permitam adesão, crescimento e maturação das células das células. Este material deve ser altamente hidratado para manter o ambiente isosmótico, permitir a rápida angiogênese, apresentar baixo nível de imunogenicidade, ser de fácil adaptação ao osso e ter a capacidade de ser fixado cirurgicamente com parafusos ou fios. Além disto, deve ser uma barreira aos tecidos vizinhos, e ser absorvido em um tempo compatível com a formação óssea<sup>5,7,10-12,19</sup>.

De acordo com Khaled *et al.* (2011), o tamanho dos poros é uma característica determinante para um arcabouço eficiente, podendo variar de 300 a 1.200 µm de diâmetro, visando facilitar a semeadura e a difusão de células, assim como nutrientes através dos poros, permitindo a migração e a proliferação celular. A porosidade de menor diâmetro não é eficiente, enquanto a de maior pode afetar propriedades mecânicas dos arcabouços<sup>19</sup>.

De acordo com Szpalski *et al.* (2012), numerosos investigadores têm estudado os arcabouços utilizados em engenharia óssea no intuito de melhorar as propriedades de biocompatibilidade, osteoindutividade, osteocondutividade, resistência mecânica, e reabsorção funcional, minimizando a inflamação e reação de corpo estranho. A associação de células-tronco adultas induzidas para diferenciação osteogênica a um arcabouço que se assemelhe o mais próximo à estrutura e à fisiologia do tecido ósseo é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea. Além disto, moléculas de sinalização celular, fatores de crescimento e estimulantes da angiogênese podem melhorar o reparo ósseo<sup>20</sup>.

Tabatabaei *et al.* (2012), em revisão sistemática de 64 estudos sobre arcabouços utilizados associados a CMI para as reconstruções maxilares, os classificaram em três principais grupos: naturais orgânicos, como a esponja de colágeno e o PRP; naturais inorgânicos, como a hidroxiapatita de coral e a fibroína da seda; polímeros sintéticos, como o PLA (ácido poli-láctico) e PLGA (ácido poli-láctico-glicólico); cerâmicas sintéticas, como a hidroxiapatita e o  $\beta$ -TCP, e compostos, como a associação de hidroxiapatita com polímeros sintéticos. De uma forma geral, os melhores resultados foram obtidos quando foram utilizados

---

arcabouços de coral, seguido dos biomateriais compostos, com mais de 80% de osteogênese. Concluíram que, até o presente momento, o arcabouço ideal, que atenda a todos os critérios para a engenharia tecidual óssea ainda não foi encontrado, e que apesar da reconstrução com osso autógeno permanecer sendo considerada a estratégia preferida para o tratamento de defeitos ósseos, a perspectiva futura da engenharia tecidual óssea inclui a aplicação da técnica da prototipagem rápida para a fabricação de arcabouços compostos customizados utilizando as imagens de tomografia computadorizada e de ressonância magnética dos pacientes associadas a células-tronco geneticamente modificadas<sup>12</sup>.

### 3.4 ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

A engenharia tecidual óssea é a construção, o reparo ou a substituição de tecido ósseo perdido em seres humanos ou animais. Pode ocorrer dentro do corpo ou extra-corporal, em um biorreator, para posterior enxertia dentro do corpo. Da engenharia tecidual vem emergindo a possibilidade de alternativas estratégicas para a regeneração óssea. Para o desenvolvimento de pesquisas dentro da engenharia tecidual são requisitos mínimos a presença de células osteoprogenitoras, um arcabouço apropriado e substratos, além de estímulos bioquímicos e biofísicos para o crescimento e a diferenciação celular. O arcabouço extra-celular fornece a estrutura física e química para orientar a proliferação e a diferenciação celular<sup>5,10-12,21</sup>.

Técnicas de reparo dos defeitos ósseos eficazes, minimamente invasivas e seguras vêm sendo testadas em pesquisas nos diversos centros de bioengenharia espalhados pelo mundo. Existem três principais estratégias terapêuticas para o reparo de perdas ósseas em pacientes: o implante células recém-isoladas ou cultivadas e induzidas para a diferenciação osteoblástica *in vitro*; o implante de um tecido semelhante a osso desenvolvido *in vitro* a partir de células cultivadas sobre um arcabouço e a regeneração de tecidos *in situ*. No implante de células induzidas osteoblásticas *in vitro*, células do paciente ou de um doador são injetadas diretamente no tecido danificado associada ou não a um arcabouço. No implante de tecido, ocorre quando um tecido tridimensional completo é cultivado *in vitro*, utilizando células autólogas ou doadores sobre um arcabouço, o qual tem que ser

---

implantado, uma vez que chegou a "maturidade". Na regeneração *in situ*, a neoformação óssea é induzida por arcabouços específicos ou por estímulos externos que são usados para estimular as células do próprio corpo a promover a reparação do tecido local<sup>10,11,22</sup>.

De acordo com Szpalski *et al.* (2012), dentro da engenharia de tecidos existem três fatores principais que podem promover rápida regeneração óssea e integração com o tecido hospedeiro: osteocondução (biomateriais), indução por fatores bioativos e transplante celular. A engenharia óssea deve fornecer osteocondutividade, auxiliando na formação e deposição de osteoblastos e subsequente mineralização da interface do biomaterial e fornecer sinais osteoindutivos como as proteínas morfogenéticas ósseas e hormônios para a formação óssea. Esses fatores também estarão diretamente interligados com o tamanho do defeito, o suprimento de células adjacentes a essa área, a velocidade de migração celular e a viabilidade de vascularização<sup>23</sup>.

Pourebrahim *et al.* (2012) afirmaram que para reduzir as complicações associadas aos enxertos ósseos autógenos, diversos biomateriais substitutos estão sendo utilizados clinicamente como a hidroxiapatita, o alfa e beta fosfato tricálcico e a matriz óssea desmineralizada. A engenharia tecidual permite a combinação destes biomateriais com osteoblastos e fatores de crescimento, proporcionando uma nova alternativa na qual células osteoprogenitoras são semeadas em um arcabouço semelhante a osso, de origem natural ou sintético, que permite a adesão e crescimento de células osteoblásticas, ou a diferenciação osteogênica de células precursoras *in vitro*. Ressaltaram que a engenharia tecidual óssea é uma área de crescimento rápido e promissora. Na engenharia de tecidos, células, a matriz extracelular e fatores de crescimento são combinados para projetar novos materiais de enxerto que podem induzir o reparo dos tecidos com base no potencial de regeneração natural<sup>24</sup>.

Estudos realizados pelo grupo de pesquisas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS com cultura, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, utilizando a BMP-4 como agente indutor, assim como derivadas de tecido adiposo, mostraram que estas células aderem e proliferam em cultura; sofrem osteoindução quando cultivadas em meio contendo proteína óssea morfogenética-4

---

(BMP-4) ou dexametasona / ácido ascórbico/  $\beta$ -glicerolfosfato (DAG), produzindo células dos diferentes estágios da linhagem osteoblástica; expressam proteínas marcadoras da linhagem osteogênica – fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina e; apresentam deposição de matriz mineralizada<sup>25-30</sup>.

Fritscher (2007) realizou um estudo *in vitro* que teve como objetivo avaliar a adesão, a proliferação e a diferenciação de células mesenquimais da medula óssea humana cultivadas sobre membrana de colágeno bovino e sobre um arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA), com a adição do gel de PRP e/ ou da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-4). Avaliou a qualidade e a velocidade da formação tecidual. Os dados obtidos indicaram que o PRP e/ ou a presença de RhBMP-4 induzem adesão, proliferação e diferenciação de células da medula óssea em células de linhagem osteogênica. Este estudo mostrou haver uma relação positiva entre a proliferação e a adesão celular com o uso do PRP. Em todos os grupos nos quais foram utilizados PRP, houve um maior número de células aderidas, tanto na membrana de colágeno, como na membrana de PLGA, quando comparados com os demais grupos<sup>29</sup>.

Eniwumide *et al.* (2007), realizaram estudo para avaliação de formação óssea ectópica nos seguintes grupos experimentais: osso autógeno; osso alógeno; osso alógeno e arcabouços de beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) associados à hidroxiapatita semeados com células-tronco derivadas da medula óssea autógena. Todos os arcabouços foram implantadas no músculo de cabras holandesas por 12 semanas. A análise tomográfica e histomorfométrica foi realizado para avaliar e quantificar a formação de osso ectópico. A análise demonstrou um aumento significativo na neoformação óssea nos arcabouço de fosfato de cálcio semeados com células-tronco derivadas da medula óssea, quando comparados aos arcabouços de osso autógeno, alógeno e alógeno semeados com células-tronco derivadas da medula óssea. Estes resultados indicam que os arcabouços de  $\beta$ -TCP associados à hidroxiapatita semeados com células mesenquimais são superiores ao enxerto autógeno, ao enxerto alógeno e ao enxerto alógeno semeado com células mesenquimais, no que se refere à de formação óssea em locais implantação ectópica<sup>31</sup>.

Loro (2009) analisou, em estudo *in vitro*, a associação de células-tronco adultas derivadas da medula óssea a um arcabouço de osso alógeno fresco

---

congelado, proveniente de banco de tecidos, em meio de cultura osteogênico DAG (dexametasona /ácido ascórbico / $\beta$ -glicerolfosfato). Os aspectos morfológicos das células osteogênicas e do arcabouço, além da expressão das proteínas osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina ósseas foram analisadas em sete, quatorze e vinte e um dias de cultura, sem e com meio osteogênico (DAG). Os resultados obtidos do sétimo dia até o vigésimo primeiro dia da pesquisa demonstraram um aumento na adesão, na migração, no crescimento e na diferenciação celular óssea. O meio DAG foi um acelerador da osteogênese, verificado principalmente, nas primeiras duas semanas. O arcabouço de osso alógeno apresentou a capacidade de suportar a osteogênese até a mineralização em todas as culturas. Assim, concluiu-se que as células derivadas da medula óssea humana podem aderir, migrar, crescer, proliferar e se diferenciar sobre um arcabouço de osso alógeno fresco congelado. O meio osteogênico acelera a adesão, a migração, o crescimento, a proliferação e a diferenciação das células tronco adultas em osteoblastos principalmente nos primeiros quatorze dias de cultura. Os osteoblastos foram obtidos a partir de células de medula óssea humana sobre o arcabouço de osso alógeno fresco congelado, mesmo sem adição de fatores osteoindutores. Finalmente, o arcabouço de osso alógeno fresco congelado é osteocondutor e osteoindutor quando associado a células-tronco adultas<sup>32</sup>.

Matsushima *et al.* (2009), avaliaram a capacidade de diferenciação osteogênica de CMIs derivadas da medula óssea humana cultivadas sobre arcabouços de hidroxiapatita e de  $\beta$ -TCP, numa densidade de  $1 \times 10^5$  células/arcabouço, em meio de cultura suplementado com soro humano, vitamina C,  $\beta$ -glicerolfosfato, e dexametasona. A cultura revelou a expressão de atividade de fosfatase alcalina, indicando que a diferenciação osteogênica das CMIs sobre os arcabouços cerâmicos, os quais foram então, implantadas no tecido subcutâneo de ratos por um período de 8 semanas. A análise topográfica da superfície dos arcabouços e a verificação da adesão celular foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura. O biomaterial permitiu não apenas a adesão das CMIs, como também a sua proliferação *in vitro* e diferenciação osteogênica. A neoformação óssea foi observado em ambos os tipos cerâmicos, sendo mais evidente sobre cerâmica de hidroxiapatita do que na de  $\beta$ -TCP. Os resultados sugerem que as CMIs humanas cultivadas sobre arcabouços cerâmicos poderiam

---

manter a sua capacidade osteogênica, mesmo após implantação ectópica, proporcionar uma base racional para o uso de CMI de um paciente e arcabouços cerâmicas de hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP na regeneração de tecido ósseo<sup>33</sup>.

Mesimaki *et al.* (2009) ressaltaram que as células-tronco derivadas do tecido adiposo, quando manuseadas corretamente e, preparadas em nível laboratorial, em condições padronizadas, podem ser consideradas seguras para a aplicação clínica. Ressaltaram ainda que associação com proteínas morfogenéticas (RhMBP-2 e RhMBP-7), como fatores de crescimento e osteoindutores, é de fundamental importância. Estes autores descreveram o primeiro caso de reconstrução de maxila secundária à hemi-maxilectomia devido a um extenso ceratocisto odontogênico através de enxerto microvascularizado ectópico personalizado, utilizando-se um arcabouço de titânio, associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo do próprio paciente e beta-trifosfato de  $\beta$ -TCP e à RhMBP 2. As células-tronco derivadas do tecido adiposo foram isoladas e cultivadas *in vitro*, induzindo a diferenciação em células mesenquimais osteogênicas e processadas de acordo com as Normas de Segurança de Terapia Celular da União Européia. O acompanhamento clínico e radiográfico do paciente - através de tomografia computadorizada - foi realizado durante 12 meses, sendo o mesmo submetido à instalação de implantes osseointegrados e à reabilitação após este período de controle. Houve a formação de osso maduro. O osso formado apresentou boa vascularização e permitiu a instalação dos implantes com excelente estabilidade primária. Este primeiro relato de utilização das células tronco derivadas de tecido adiposo seguindo um protocolo técnico, provavelmente servirá de base para outros estudos experimentais em pacientes<sup>34</sup>.

Beltrão (2010) realizou estudo *in vitro* com objetivo de avaliar a adesão, a proliferação e a diferenciação das células da medula óssea humana em superfícies de implantes de titânio com e sem deposição discreta de fosfato de cálcio. Os resultados indicaram que a rugosidade da superfície dos discos de titânio possibilita a adesão, diferenciação e proliferação celular e que a presença de nanopartículas de fosfato de cálcio na superfície dos implantes aumenta a proliferação celular e a diferenciação celular<sup>35</sup>.

Fritscher (2011) realizou estudo para avaliar a influência de células mononucleares de medula óssea cultivadas sob membranas de colágeno no reparo

---

de defeitos ósseos em fêmur de ratos. Concluiu que o uso de CMMO associada a este biomaterial não contribui para acelerar o processo de reparo ósseo, podendo inclusive atrasar este processo, uma vez que o organismo terá que reabsorver o biomaterial, ao mesmo tempo em que deverá estar formando novo osso<sup>36</sup>.

Ye *et al.* (2012) investigaram o efeito da diferenciação osteogênica *in vitro* de CMIs cultivadas sobre um arcabouço de cerâmica porosa de  $\beta$ -TCP, após implantação subcutânea em ratos. Após o isolamento a partir de aspirados de medula óssea humana, as CMMO foram divididas em três partes: uma parte foi semeada em cerâmica porosa de  $\beta$ -TCP imediatamente e transplantadas em camundongos; duas partes foram expandidas *in vitro* até a segunda passagem antes da semeadura da células e do transplante *in vivo*, em condições osteogênicas ou não. Os animais foram sacrificados após 4, 8, 12, 16 e 20 semanas após a implantação para avaliação tomográfica e histológica. Os resultados mostraram que a clonogenicidade, a taxa de proliferação e a eficácia da semeadura não foi significativamente afetadas pela diferenciação osteogênica, quando comparadas com as CMIs. Foi observada neoformação óssea nos poros de todos os arcabouços semeados com células mesenquimais osteodiferenciadas após 4 semanas da implantação, a qual foi mantida durante 20 semanas. Pelo contrário, nos arcabouços contendo CMIs foi observada neoformação óssea limitada em apenas em 1 dos 6 casos após 8 semanas da implantação, a qual foi mantida durante 4 semanas. Para os arcabouços com CMMO, tecido ósseo neoformado foi observado esporadicamente em apenas um caso após 8 semanas da implantação. No geral, este estudo sugere que a osteogênese ectópica em arcabouços de compostos cerâmicos semeados com CMMO é mais dependente da condição de expansão *in vitro*, e que as células mesenquimais osteodiferenciados apresentam o maior potencial em regeneração óssea *in vivo*<sup>37</sup>.

Pourebrahim *et al.* (2012) realizaram estudo comparativo em cães entre a reconstrução óssea de fenda alveolar maxilar através de tecido ósseo produzido por engenharia tecidual, por meio do cultivo de células-tronco mesenquimais isoladas a partir de tecido adiposo subcutâneo canino e cultivadas em uma densidade de  $5 \times 10^6$  sobre um arcabouço de hidroxiapatita /  $\beta$ -TCP, em meio osteogênico por 21 dias, e a reconstrução óssea por enxerto ósseo autógeno. A regeneração óssea foi avaliada por histomorfometria 15 e 60 dias após a reconstrução das fendas

---

alveolares. Na reconstrução realizada com enxerto ósseo autógeno foi observada maior neoformação óssea quando comparada com a reconstrução realizada com células-tronco mesenquimais em 15 e 60 dias, 45% e 96% contra 5% e 70%, respectivamente. Concluiu que, embora enxerto ósseo autógeno ainda seja considerado o padrão-ouro para a regeneração óssea, a engenharia de tecidos do osso pode fornecer uma alternativa aceitável<sup>24</sup>.

### 3.4 ENXERTO ÓSSEO BOVINO LIOFILIZADO

O enxerto ósseo bovino liofilizado tem sido utilizado de forma crescente em cirurgia ortopédica e buco-maxilo-facial devido à disponibilidade quase ilimitada e grande semelhança física e química ao osso humano. Por ser um xenoenxerto apresenta como desvantagem a possibilidade de desencadear uma resposta imunológica e reações inflamatórias indesejadas. Muitos estudos foram realizados para desenvolver um protocolo ideal de processamento físico e químico, visando minimizar os riscos e diminuir a antigenicidade, tornando osso bovino liofilizado uma alternativa aceitável para os auto-enxertos<sup>38</sup>.

Galia *et al.* (2008) realizaram estudo para avaliar, *in vitro* e *in vivo*, a biocompatibilidade do osso bovino liofilizado fabricado em escala semi-industrial (OrthoGen® - Baumer S.A., BR), por modificação de um protocolo desenvolvido originalmente por Kakiuchi *et al.* (1996), visando minimizar as alterações mecânicas, físicas e químicas, reduzir o teor de gordura, e aumentar a pureza do enxerto ósseo. Os seguintes testes foram realizados: citotoxicidade *in vitro*, toxicidade sistêmica aguda *in vivo*, potencial de irritação bucal *in vivo*, reação pirogênica *in vitro*, e carga microbiana. A avaliação *in vitro* do osso esponjoso bovino liofilizado revelou a ausência de citotoxicidade, em 100% das amostras. Em relação a avaliação *in vivo* de toxicidade sistêmica aguda, realizada em ratos do sexo masculino, nem anomalias macroscópicas nem mortes foram observadas nos animais testados. A pirogenicidade não foi maior do que 0,125 UE/mL em qualquer das amostras. A carga microbiana revelou resultados negativos para o crescimento microbiano antes da esterilização. Em relação ao potencial de irritação bucal, na avaliação *in vivo* em 24 e 72 horas mostraram que os animais não apresentaram eritema ou edema na mucosa oral. Concluíram que as mudanças estabelecidas pelos autores para

---

preparar o osso medular bovino liofilizado em escala semi-industrial é reprodutível e produziu um produto com excelente biocompatibilidade<sup>38,39</sup>.

Galia *et al.* (2009) realizaram um estudo para verificar as similaridades físico-químicas entre os ossos liofilizados humanos e bovinos produzidos a partir de um protocolo de processamento desenvolvido pelos autores, por meio de análises de suas composições orgânicas e minerais. O processo de liofilização visou manter as características do tecido processado o mais próximo possível do osso *in natura*, subtraindo apenas os possíveis agentes imunogênicos, como células medulares e gordura; quebrando quimicamente as cadeias proteicas e retirando agentes infecciosos bacterianos, virais e prionicos. Os percentuais de extrato etéreo (gordura bruta), proteína total (nitrogênio total) e composição mineral (fósforo total, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> total, cálcio total, sódio total, cinzas e cloretos) das amostras de ossos humanos e bovinos liofilizados foram determinados. Os resultados da composição orgânica e mineral das amostras estão expressos nas tabelas 1 e 2. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre ossos bovinos e humanos após o processo de liofilização. Através da avaliação das características físicas e químicas das amostras de osso liofilizado bovino, conclui-se que, o método de processamento físico-químico sugerido pelos autores preserva todas as características do osso original e de similaridades com o osso humano, levando a um produto final com boa biocompatibilidade excelente capacidade de osteocondução<sup>13</sup>.

**Tabela 1.** Resultados da composição orgânica das amostras de osso humano e bovino liofilizados

Elementos (%)	Osso Liofilizado	
	Bovino*	Humano*
Proteína Bruta	27,20	27,53
Extrato Etéreo	0,14	0,06
pH	7,41	7,58

\*NS – não significativo, teste t de Student.

Fonte: Galia *et al.* Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. Rev. Col. Bras. Cir. 2009;36(2):157-60<sup>13</sup>.

**Tabela 2.** Resultados da composição mineral das amostras de osso humano e bovino liofilizados

Elementos (%)	Osso Liofilizado	
	Bovino*	Humano*
Nitrogênio total	4,30	4,30
Fósforo total	11,90	11,90
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total	27,20	27,10
Cálcio total	23,70	24,06
Ca/P	1,99	2,06
Sódio total	0,46	0,57
Cinzas	64,30	64,80
Cloretos	1,30	1,30

\*NS – não significativo, teste t de Student.

Fonte: Galia *et al.* Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. Rev. Col. Bras. Cir. 2009;36(2):157-60<sup>13</sup>.

Galia *et al.* (2011) realizaram estudo com objetivo de caracterizar as propriedades físico-químicas do osso medular bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A., BR) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difratometria de raios-X, análise por termogravimetria, análise de calorimetria exploratória diferencial e análise por infravermelho. A análise da estrutura microscópica por MEV/EDS revelou que o produto apresenta estrutura típica de osso medular com poros interconectados, e que, após o processo físico-químico ao qual a matéria prima é submetida para fabricação, foi possível manter a estrutura característica desse tipo de tecido. A presença dos poros e a manutenção da estrutura cristalina trabeculada do osso são fatores fundamentais para sucesso dos fenômenos celulares de deposição de células osteoprogenitoras sobre o enxerto, reabsorção do mesmo e neoformação óssea. Os minerais cálcio e fósforo foram os principais componentes encontrado nas amostras - 60% e 28%, respectivamente. Foi determinado o tamanho dos poros a partir das análises obtidas no MEV. O tamanho médio dos poros foi 316 µm (dp =

146,7 $\mu$ m), variando de 91,2 a 497,8 $\mu$ m, e 333,5 $\mu$ m (dp = 304,8 $\mu$ m), variando de 87,2 a 963,9  $\mu$ m, nos aumentos de 50 x e 150 x, respectivamente<sup>40</sup>.

Através dos estudos de Galia *et al.* (2008, 2009 e 2011), conclui-se que osso medular bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A., BR), com estrutura física (porosa-trabeculada) e composição química (mineral-colagenosa) comparável ao osso humano é uma alternativa para atender a alta demanda de pacientes com necessidade de enxertos. Após o processamento desenvolvido pelos autores, mantém a estrutura química orgânica e inorgânica original do osso. Essa estrutura mista final é composta por uma porção orgânica (25-30% de proteínas colagenosas) e uma porção mineral (65-70% de hidroxiapatita), livre de resíduos medulares, gordura, metais pesados, componentes celulares e agentes antigênicos. Sua estrutura porosa e firme permite rápida vascularização, deposição e proliferação de células osteogênicas tanto sobre a sua superfície quanto no seu interior, servindo como um suporte para formação de osso novo por osteocondução<sup>13,38,40</sup>.

Encarnação *et al.* (2011), verificaram que o uso do osso bovino em bloco para as reconstruções ósseas dos rebordos alveolares é uma opção de tratamento viável e segura, principalmente com relação à redução da morbidade ao paciente, porém, demanda tempo de reparo maior em relação aos enxertos autógenos, previamente a instalação dos implantes<sup>41</sup>.

Sauerbier *et al.* (2010) realizaram um estudo comparativo da utilização de osso bovino mineral sozinho e associado às CMI em levantamento do seio maxilar bilateral em 6 ovelhas; de um lado utilizaram osso bovino mineralizado associado a CMI e do lado contralateral apenas osso bovino mineralizado. Os animais foram eutanasiados após 8 e 16 semanas e as áreas de enxertia óssea foram analisadas através de tomografia computadorizada, histologia e histomorfometria. Observou-se que os volumes iniciais nos dois lados eram semelhantes e não houve alteração significativa com o tempo. Histologicamente, observou-se uma boa interconexão das partículas osso bovino mineralizado com osso neoformado. A formação óssea foi significativamente mais rápida – em torno de 49%, no lado onde foi utilizado osso bovino mineralizado associado às CMIs. Os autores concluíram que a associação de CMIs ao osso bovino mineralizado acelerou o processo de formação óssea na técnica de enxertia óssea com o levantamento do seio maxilar, o que poderia permitir a instalação mais rápida dos implantes dentários<sup>42</sup>.

---

Zhao *et al.* (2013) realizaram estudo comparativo da reconstrução de defeito ósseo de 8 mm em rebordo orbital de ratos em três grupos experimentais: somente utilizando enxerto ósseo bovino esponjoso, utilizando um arcabouço de osso bovino semeado com células mesenquimais derivadas da medula óssea, e utilizando arcabouço de osso bovino semeado com células mesenquimais osteogenicamente induzidas. Foram realizadas análise tomográfica, histológica e histomorfométrica depois da implantação. No grupo onde a reconstrução foi realizada com osso bovino associado a células mesenquimais osteogenicamente induzidas a análise tomográfica após 12 semanas da implantação mostrou uma perfeita reparação do defeito orbitário, e a análise histológica mostrou a reabsorção quase que total do osso esponjoso bovino e evidente neoformação óssea ( $57,12 \pm 6,28\%$ ), com união das trabéculas ósseas. Em contraste, no grupo onde a reconstrução foi realizada com osso bovino associado a CMI foi observada a maior presença de osso bovino residual, menor neoformação óssea e menor união das trabéculas ósseas, e no grupo onde foi realizada a reconstrução somente com osso bovino, observou-se uma pequena quantidade de osso neoformado e uma lenta reabsorção do enxerto ósseo e envolvimento por tecido conjuntivo fibroso. Concluíram que a associação de células mesenquimais derivadas da medula óssea, osteogenicamente induzidas, ao osso bovino medular, é uma estratégia promissora para a engenharia tecidual óssea<sup>43</sup>.

### 3.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na terapia de reconstrução óssea foi introduzido na década de 1990. Desde então, muitos cientistas e médicos têm utilizado isso em cirurgias ortopédicas e bucais. O PRP é um produto derivado do processamento laboratorial pela centrifugação em velocidade baixa de sangue autógeno. Técnica de dupla centrifugação é necessária para um processamento efetivo do concentrado plaquetário. A primeira centrifugação, denominada “*hard spin*” separa as células vermelhas do plasma, a segunda centrifugação, chamada “*soft spin*” concentra as plaquetas formando assim duas camadas: o PRP e o plasma pobre em plaquetas (PPP). Após essas duas fases de processamento a geleificação do PRP é obtida pela adição de íons cálcio (cloreto de cálcio ou o gluconato de

---

cálcio a 10%). Alguns protocolos adicionam também trombina autóloga ou bovina. O processo de obtenção do PRP tornou-se prático, com fácil uso no trans-cirúrgico, e efetivo em diversas cirurgias bucais<sup>44-46</sup>.

Diversos estudos têm sido relatados mostrando a influência do PRP nos processos de reparo ósseo. Sua estratégia terapêutica fundamenta-se na aceleração da cicatrização através da concentração dos fatores de crescimento que influenciam o crescimento, a quimiotaxia, a diferenciação e proliferação de células ósseas. A associação do PRP aos enxertos ósseos visa acelerar e melhorar a qualidade da regeneração óssea devido à quantidade acentuada destes fatores. Isto ocorre porque as células da medula óssea, presentes no enxerto, possuem receptores para os fatores de crescimento e a presença do PRP reduz significativamente o tempo para a maturação e consolidação do enxerto ósseo<sup>15,21,44-46</sup>.

A ação conjunta dos fatores de crescimento derivados das plaquetas resulta na sinalização para que células mesenquimais e epiteliais migrem para o local lesado, sofram divisão mitótica, estimulem a síntese de matriz e colágeno, resultando assim em uma cicatrização mais rápida e eficiente. Além disto, outras proteínas das plaquetas como fibrina, fibronectina e vitronectina, atuam promovendo a adesão celular e osteocondução<sup>15,21,44-46</sup>.

A literatura revela resultados controversos em relação ao uso de gel de plaquetas na regeneração ósseas. Uma provável explicação deste fato é a utilização de diferentes protocolos para obtenção de PRP. A obtenção de um número reduzido de plaquetas no PRP, bem como a fragmentação ou ativação precoce das plaquetas durante a coleta e manuseio do sangue, pode resultar na liberação dos fatores de crescimento antes do preparo do gel, o que irá influenciar o sucesso desse procedimento<sup>21,47,48</sup>.

O PRP deve possuir a concentração mínima de 1.000.000 plaquetas/ $\mu$ l, ou seja, as plaquetas estão 4 a 7 vezes mais concentradas, para ser considerado clinicamente eficiente no aumento da capacidade regenerativa. Os mesmos autores relatam que em um coágulo comum há a presença de, aproximadamente, 94% de hemácias, 6% de plaquetas, e menos de 1% de leucócitos. No PRP esse valor muda, encontrando-se em média 94% de plaquetas, 5% de hemácias e 1% de leucócitos<sup>44</sup>.

---

Rossi Júnior & Souza Filho (2004) descreveram um protocolo de obtenção de PRP de modo simplificado, dispensando a necessidade da utilização de equipamentos de alto custo e sofisticados. Segundo o protocolo descrito por estes autores, o PRP é obtido da seguinte forma: 1. Obtenção de sangue venoso através de punção periférica na quantidade aproximada de 20 mL, colhidos em tubos de vácuo de 4,5 mL contendo citrato de sódio; 2. Centrifugação dos tubos em centrífuga de 8 x 15 mL a 200 g (800 rpm por 10 min). A porção celular (leucócitos e hemácias) irá precipitar no final do tubo e o plasma contendo as plaquetas irá sobrenadar. 3. O plasma, contendo as plaquetas, é pipetado diretamente dos tubos e acondicionado em dois tubos de 4,5mL. Desta maneira obtêm-se aproximadamente 4 mL em cada tubo. 4. Uma segunda centrifugação a 400 g é efetuada por 10 minutos e ao seu término, o tubo exibe um botão plaquetário ao fundo e o plasma sobrenadante. Parte dessa porção plasmática (50%) é retirada por pipetagem e acondicionada em outro tubo (o que constitui o PPP) enquanto o restante é ressuspenso, constituindo o P.R.P. Para obtenção do gel de PRP adiciona-se ao PRP obtido uma solução de trombina autógena obtida a partir da adição de glucanato de cálcio a 10% ao PRP, a mistura é mantida em banho-maria a 37° C até a sua geleificação parcial<sup>49,50</sup>.

Zhang *et al.* (2011) avaliaram CMIs derivadas da medula óssea cultivadas sobre arcabouços de coral natural poroso associadas a PRP. As CMIs foram semeadas em discos de coral numa densidade de  $5 \times 10^6$  em 50  $\mu$ L de PRP e cultivados *in vitro*, sendo a atividade da fosfatase alcalina avaliada em 7 e 14 dias. Em outro grupo, os arcabouços semeados com CMIs associadas a PRP foram implantados no tecido subcutâneo de ratos, sendo o nível de formação de osso ectópico avaliado após 4 e 8 semanas. Discos de coral semeados somente com CMIs ou somente com PRP foram utilizados como controle nos dois grupos avaliados. As amostras do grupo coral / PRP / CMIs cultivadas *in vitro* exibiram significativamente maior atividade da fosfatase alcalina, em comparação à aquelas cultivadas somente com CMIs ou PRP. Neoformação óssea pode ser observada em ambos os grupos: coral / PRP / CMIs e grupo coral / CMIs nos locais de implantação ectópica. No grupo coral / PRP não foi observada neoformação óssea. As análises histomorfométricas mostraram neoformação aumentada de cartilagem e / ou a osso no grupo coral / PRP / CMIs, 4 e 8 semanas após a implantação. Os autores concluíram que a associação de PRP a CMIs em arcabouços de coral natural

---

poroso poderia melhorar a atividade da fosfatase alcalina e aumentar formação óssea ectópica<sup>51</sup>.

### 3.6 FIBRONECTINA

A fibronectina (FN) é uma das principais proteínas de matriz extracelular, é reconhecidamente uma molécula com funções de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Liga-se a receptores proteicos da membrana celular chamados integrinas, podendo estabelecer ligações com outras moléculas tais como: colagénio, fibrina e heparina. É encontrada em todos os organismos vertebrados sob duas formas fundamentais: uma forma solúvel no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais, ativando a coagulação, cicatrização e a fagocitose, e uma forma insolúvel, compondo a matriz extracelular de diversos tecidos. Esta proteína adesiva tem sido utilizada em ensaios *in vitro*, recobrando a superfície de diversos tipos de biomateriais, como um dos métodos de bioativação de materiais regenerativos, permitindo a interação específica com receptores celulares e promovendo uma maior adesão celular<sup>14,52-57</sup>.

De acordo Zhang *et al.* (2007), o sucesso do uso de arcabouços em engenharia óssea depende da manutenção de uma interface apropriada à formação de tecido ósseo, visto que as propriedades de superfície dos biomateriais e das células influenciam os eventos observados na interface célula-material resultando ou não na biocompatibilidade. A modificação de superfície dos biomateriais aparece como uma alternativa para regular os eventos interfaciais sem alterar suas propriedades mecânicas. Neste contexto, estratégias biomiméticas vêm sendo empregadas. A principal delas consiste na imobilização de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos na superfície de biomateriais. A adsorção de FN e/ou de uma de suas sequências de peptídeos RGD (arginina – glicina – ácido aspártico) à superfície dos biomateriais pode promover uma maior adesão celular mediada por integrinas. Desta forma, as propriedades de superfície de arcabouços podem ser melhoradas através da biomimetização utilizando FN<sup>58</sup>.

Mendonça *et al.* (2009), realizaram estudo *in vitro* adicionando FN sérica humana em uma concentração de 10 µg/cm<sup>3</sup> à superfície de arcabouços de polihidroxibutirato a fim de otimizar a adesão de osteoblastos humanos. Visando

---

criar sítios para a imobilização de FN, os arcabouços foram previamente tratados por meio de reação com etilenodiamina. O tratamento modificou a morfologia e a composição química dos arcabouços, possibilitando um aumento no teor de FN adsorvido à superfície, resultando em uma superfície com propriedades adesivas para as células, no entanto, não houve um aumento na adesão de osteoblastos humanos a estes materiais, provavelmente devido à diferença de conformação adotada pela FN na superfície do arcabouço, com a modificação da exposição dos pontos de adesão<sup>14</sup>.

Sevilla *et al.* (2010) demonstram em estudo *in vitro* com fibroblastos embrionárias de rato que uma matriz extracelular de FN induziu a adesão celular sobre um substrato de colágeno tipo I, com proliferação celular e a formação de estruturas multicelulares, de forma progressiva, de acordo com as concentrações de FN utilizadas<sup>52</sup>.

Kuzmenko *et al.* (2013) realizaram estudo *in vitro* associando células endoteliais do cordão umbilical humano e células tronco mesenquimais de ratos a um arcabouço de nanocelulose bacteriana, visando aumentar a aderência celular, a superfície do biomaterial foi modificada com duas proteínas, a FN e o colágeno tipo I, em ambos os casos, a modificação da superfície aumentou o número de células ligadas à superfície, além de apresentar morfologia de células mais saudáveis e viáveis<sup>56</sup>.

Linsley *et al.* (2013) estudaram o efeito das diferentes proteínas da matrix extracelular: fibrinogênio (10mg/mL), colágeno tipo I (1mg/mL) e fibronectina (10 µg/mL), na cultura de CMI e na diferenciação em osteoblastos. Os resultados sugerem que a diferenciação osteogênica das CMI é influenciada tanto pelas condições do meio de cultura quanto pelo substrato, os quais em conjunto têm um efeito sinérgico, constituindo um complexo biomimético para o cultivo e para a diferenciação osteoblástica<sup>57</sup>.

---

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ASPECTOS BIOÉTICOS

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia (CCEFO – 0021/12) (Anexo A) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA –12/00285) (Anexo B) da PUCRS. Foram seguidos os preceitos apresentados na Lei N° 11.794 de 11 de outubro de 2008 e do Guia de Uso e Cuidado com Animais de Laboratório do National Institute of Health (EUA) adotados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A fase experimental do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

### 4.2 ANIMAIS

Neste estudo foi utilizado para a obtenção das células mononucleares da medula óssea (CMMO) um rato Kyoto, isogênico, do sexo masculino, entre 55 a 75 dias de vida, adquirido da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS.

### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No presente trabalho foi realizada a análise *in vitro* da cultura de células mononucleares da medula óssea sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado, sendo avaliados quatro grupos:

**a) Grupo 1:** Composto por suspensão de CMMO, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células / poço, sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado;

---

- b) Grupo 2:** Composto por suspensão de CMMO associadas a PRP, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células / poço, sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado;
- c) Grupo 3:** Composto por suspensão de fibroblastos da linhagem *NIH (National Institute of Health) 3T3*, numa densidade de  $5 \times 10^4$  células / poço, sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado, sendo este o grupo controle;
- d) Grupo 4:** Composto por suspensão de CMMO, numa densidade de  $15 \times 10^4$  células / poço sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado.

As amostras de osso bovino liofilizado foram distribuídas pelos quatro grupos em triplicata em três placas de cultura com 24 poços e avaliadas em três tempos: 72 h, 96 h e 192 h. Para a determinação dos períodos de cultura ideais para a análise das amostras, foi realizado o monitoramento diário, através da observação direta das placas de cultura em microscópio óptico, da presença de CMMO aderidas, assim como da proliferação destas células.

#### 4.4 MEIO DE CULTIVO CELULAR

O meio de cultura celular utilizado no presente estudo foi o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media* - Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS, Sorali Biotecnologia, BR), penicilina (100 U/mL, Invitrogen, USA), estreptomicina (100 µg/mL, Invitrogen, USA) e gentamicina (10µg/mL, Invitrogen, USA).

#### 4.5 OBTENÇÃO DO OSSO BOVINO LIOFILIZADO

O osso bovino liofilizado foi doado pela empresa Baumer S.A. – Divisão de Biomateriais - OrthoGen®, após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Tecnologia da Unidade Genius Baumer S.A. Foram confeccionados blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura especialmente para a pesquisa (Figuras 1 e 2). Todas as amostras fornecidas foram preparadas de acordo com os protocolos de processamento do OrthoGen® e esterilizados através de radiação gama.

---



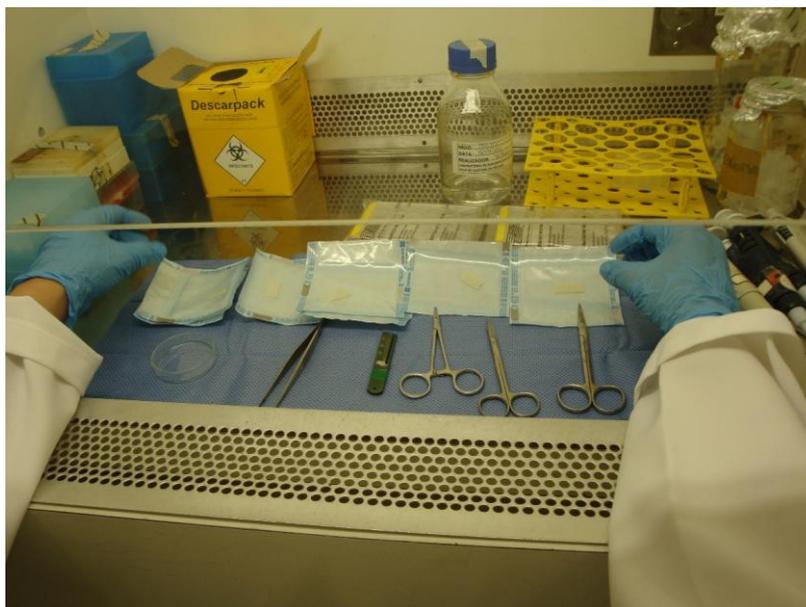
**Figura 1. Enxerto ósseo bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A.).**



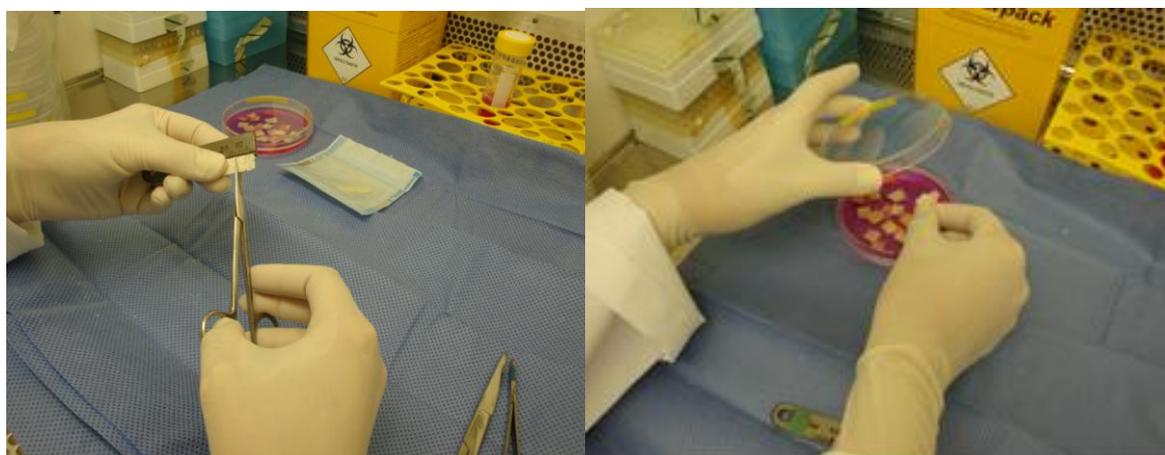
**Figura 2. Osso bovino liofilizado - OrthoGen®. Conforme preparado pela Baumer S.A. para a confecção de blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura.**

#### 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO

O osso bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A., BR) foi cuidadosamente recortado em blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura, utilizando-se capela de fluxo laminar visando à manutenção da esterilização do material (Figura 3). As amostras foram incubadas em meio DMEM por 72 h na estufa a 37 °C, visando à neutralização do pH do material (Figura 4). Após este período, o meio foi aspirado, sendo realizada a lavagem das amostras com PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen, USA) e a aspiração da solução e, em seguida, as amostras foram colocadas em placas de cultura de 24 poços, para ser realizada a aplicação de fibronectina sérica humana na concentração de 1 mg/mL, cedida pelo Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Um mililitro de fibronectina (1 µL/mL em PBS), na concentração final de 1 µg/mL, foi colocado em cada poço e as placas incubadas a 4 °C por 96 h (Figuras 5 e 6). Após este período, as placas foram transferidas para estufa a 37 °C e incubadas 30 min. Posteriormente, o sobrenadante contendo PBS e fibronectina foi aspirado e as amostras do OrthoGen® foram distribuídas em novas placas de 24 poços às quais foi adicionado meio DMEM suplementado.



**Figura 3. Preparo das amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® em capela de fluxo laminar do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.**

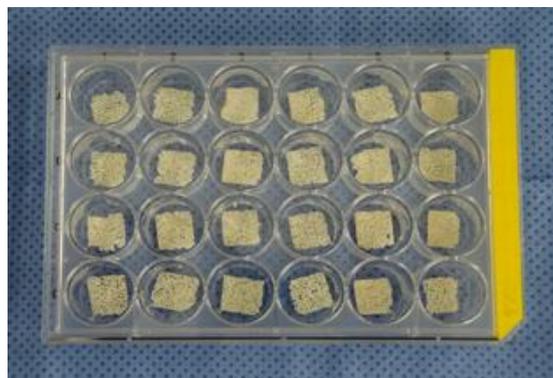


**Figura 4. Amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - recortadas em blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura em meio DMEM.**

---



**Figura 5. Amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - sendo colocadas em placa de cultura de 24 poços.**

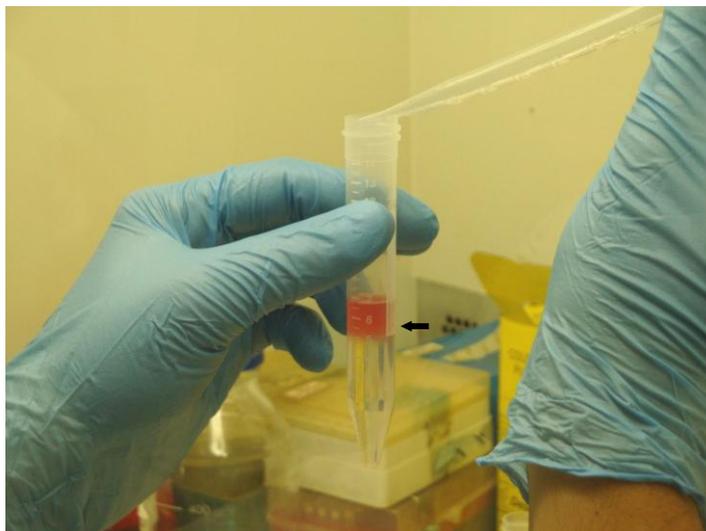


**Figura 6. Disposição das amostras do osso bovino liofilizado - OrthoGen® - na placa de cultura de 24 poços para ser realizada a aplicação de fibronectina.**

#### 4.7 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR

A extração das células da fração mononuclear de medula óssea do rato Kyoto doador foi realizada após a realização de eutanásia utilizando-se injeção intraperitoneal de 0,4 a 0,6 mL de solução com 0,8% de ketamina (Dopalen®) e 0,2% de clorpromazina (Torazina®), conforme o peso do animal.

As células foram obtidas através da lavagem dos fêmures, tíbias e úmeros do rato Kyoto em capela de fluxo laminar. As epífises ósseas foram seccionadas e a extração do estroma medular foi obtida pela introdução de uma agulha 32 G x 1/2" nas extremidades ósseas, sendo o interior dos ossos longos lavado com meio de cultura RPMI1640 (Gibco®, USA) com heparina 5.000 U.I. (Hepamax-S®) na proporção de 50 mL:1 mL. Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade de Histopaque® (1,119 g/mL) (Sigma-Aldrich) e centrifugada a 400 g durante 30 min, a 21 °C (MSE Harrier 18/80, USA). A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9 % estéril (Figura 7). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul tripan 0,4 % (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA - USA), e quantificada em câmara de Neubauer (Loptik Labor, Alemanha).



**Figura 7. Células mononucleares da medula óssea (seta) após centrifugação em gradiente de Histopaque®.**

#### 4.8 PREPARO DOS CONCENTRADOS DE PRP

Para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), foi realizada a punção cardíaca após a realização da eutanásia do rato Kyoto, previamente à extração da fração mononuclear de medula óssea. O sangue aspirado (aproximadamente 4 mL) foi acondicionado em um frasco contendo citrato de sódio a 3,2% (Vancuonet, USA) como anticoagulante. O protocolo simplificado adotado para a obtenção do PRP foi o preconizado por Rossi *et al.* (2004) de dupla centrifugação: a primeira centrifugação a 200 g durante 10 min a 21 °C e a uma segunda centrifugação a 400 g durante 10 min a 21 °C (Centrifuge 5417 C, USA). Após a primeira centrifugação, a porção celular (hemácias) precipita na porção final do frasco e o plasma rico em plaquetas contendo leucócitos sobrenada. A porção que contém o plasma e as plaquetas (porção superior até o limite da zona de névoa) foi coletada delicadamente e acondicionada em um microtubo. A segunda centrifugação foi efetuada e ao seu término, o microtubo exibiu um botão plaquetário ao fundo e o plasma sobrenadante. Parte desta porção plasmática foi retirada por pipetagem e acondicionada em outro microtubo constituindo o Plasma Pobre em Plaquetas - PPP), enquanto o restante é ressuspenso, constituindo o PRP. Em seguida, foi adicionada solução de gluconato

---

de cálcio a 10%, em quantidade equivalente a 50% do PRP obtido, conforme descrito por Rossi *et al.* (2004)<sup>49</sup>. Após a geleificação (37 °C por 15 min), 100 µL de PRP foram adicionados à suspensão de células mononucleares que constituiu o grupo 2 deste estudo.

#### 4.9 PREPARO DOS FIBROBLASTOS

Os fibroblastos da linhagem *NIH (National Institute of Health) 3T3*, provenientes de camundongos, foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sendo cultivados em meio de cultura DMEM suplementado. Após tripsinização, os fibroblastos foram plaqueados a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço para serem utilizados como controle.

#### 4.10 PREPARO DAS PLACAS

As células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre os blocos de 10 mm de largura x 10 mm de altura x 1 mm de espessura de osso bovino liofilizado - OrthoGen® - Baumer S.A., os quais foram distribuídos pelos quatro grupos em triplicata em três placas de cultura, para serem avaliadas em três tempos: 72 h, 96 h e 192 h. Em cada poço da placa de cultura foi colocado 1 mL da suspensão contendo células da fração mononucleares de medula óssea e meio DMEM, sendo as culturas mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (Figura 8). Para o controle de crescimento celular foram ainda mantidos dois poços em cada placa de cultura, para cada tempo da avaliação, contendo apenas fibroblastos (controle positivo) e dois poços contendo apenas células mononucleares de medula óssea - controle experimental (Figura 9).

---

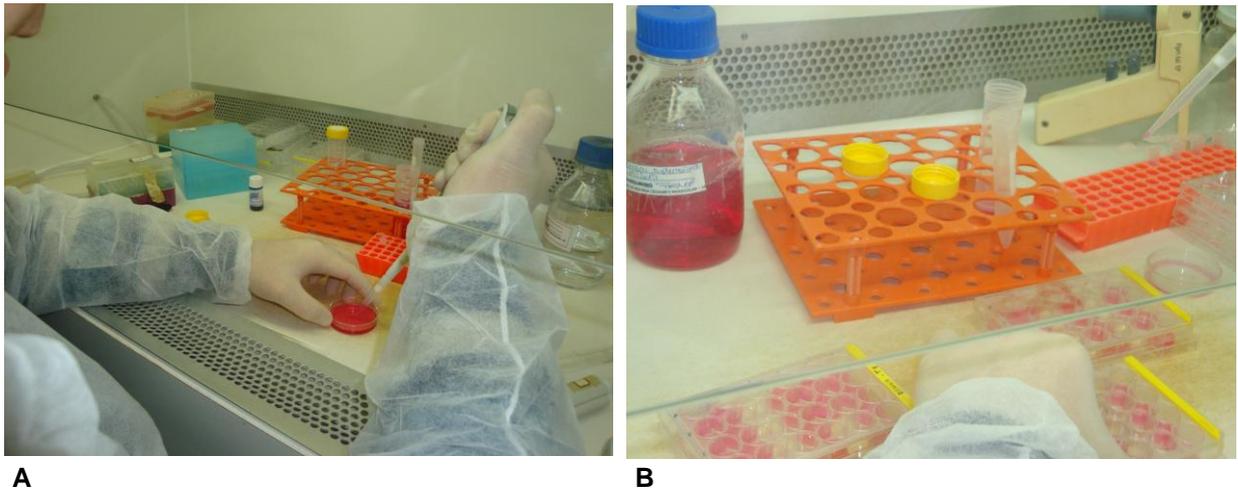


Figura 8. A. Preparo das suspensões contendo CMMO e meio DMEM. B. Distribuição das suspensões sobre os blocos de osso bovino liofilizado - OrthoGen® nas três placas de cultura de 24 poços.

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Figura 9. Esquema representativo da disposição das amostras nos poços da placa de cultura. GRUPO 1 (1A, 1B e 1C): osso bovino liofilizado + CMMO; GRUPO 2 (2A, 2B e 2C): osso bovino liofilizado + CMMO + PRP; GRUPO 3 (3A, 3B e 3C): osso bovino liofilizado + fibroblastos (3T3); GRUPO 4 (4A, 4B e 4C): osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$  células/poço); CONTROLE POSITIVO: 5A e 5B (fibroblastos); CONTROLE EXPERIMENTAL: 5C e 5D (CMMO).

#### 4.11 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A COLORAÇÃO PELO DAPI

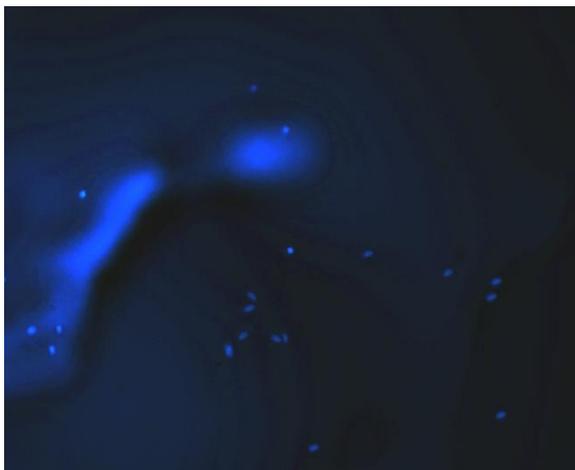
As culturas foram incubadas com o agente intercalante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para coloração nuclear visando à avaliação de densidade populacional. Duas amostras de cada grupo foram fixadas com 1 mL de paraformaldeído a 4% por 20 min, em seguida lavadas duas vezes com PBS. Após este período, as amostras foram incubadas com o DAPI 1:10.000 em 0,9% de solução salina por 20 min em temperatura ambiente. O DAPI foi aspirado e as amostras foram lavadas por três vezes com PBS, para a posterior detecção dos núcleos corados em microscópio confocal.

#### 4.12 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE POPULACIONAL

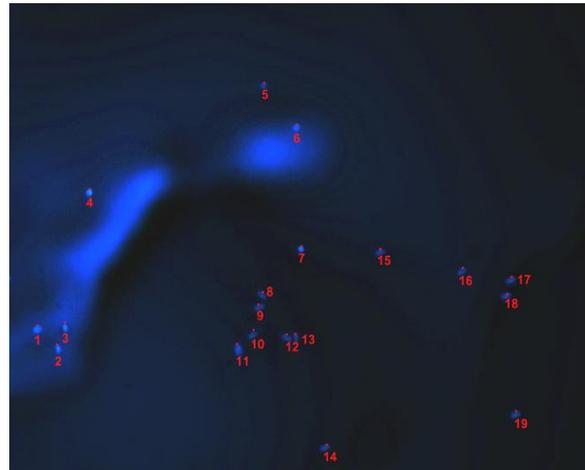
Foi realizada a avaliação de densidade populacional através da mensuração do número de células aderidas aos arcabouços de osso bovino liofilizado, após 72 h, 96 h e 192 h, por meio da detecção da coloração nuclear pelo DAPI. A análise foi realizada utilizando-se microscopia confocal. Foi utilizado o microscópio ECLIPSE TE 2000-S (NIKON) do Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS.

Foram avaliadas duas amostras de cada grupo nos três tempos estudados, sendo realizadas 12 fotos (campos) de cada amostra no aumento de 100 x, de forma aleatória, mas procurando-se observar toda a amostra. A quantificação foi realizada através da contagem do número de núcleos observados em cada campo fotografado, por um avaliador, após a aplicação do teste de replicabilidade em 10 amostras selecionadas de forma aleatória, realizado em dois momentos, visando à calibração da contagem do número de núcleos corados. O Índice de Correlação Intraclasse (ICC) obtido foi de 0,99, considerado excelente para a replicabilidade, segundo FLEISS (1986)<sup>59</sup>. Utilizou-se o programa PhotoScape versão 3.5 e para a quantificação nuclear foi utilizada a ferramenta Paint Brush. Foram selecionadas as imagens com as marcações nucleares mais intensas e regulares, todas as amostras foram avaliadas em dois momentos, sendo considerada para a quantificação a segunda avaliação.

---



**Figura 10. Fotomicrografia de células coradas com DAPI - 100 x.** Imagem original das células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado (Grupo 4, 96 h).



**Figura 11. Ilustração do método empregado para quantificação dos núcleos corados pelo DAPI usando o software PhotoScape e a ferramenta Paint Brush.** Células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado (Grupo 4, 96 h).

#### 4.13 PREPARO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

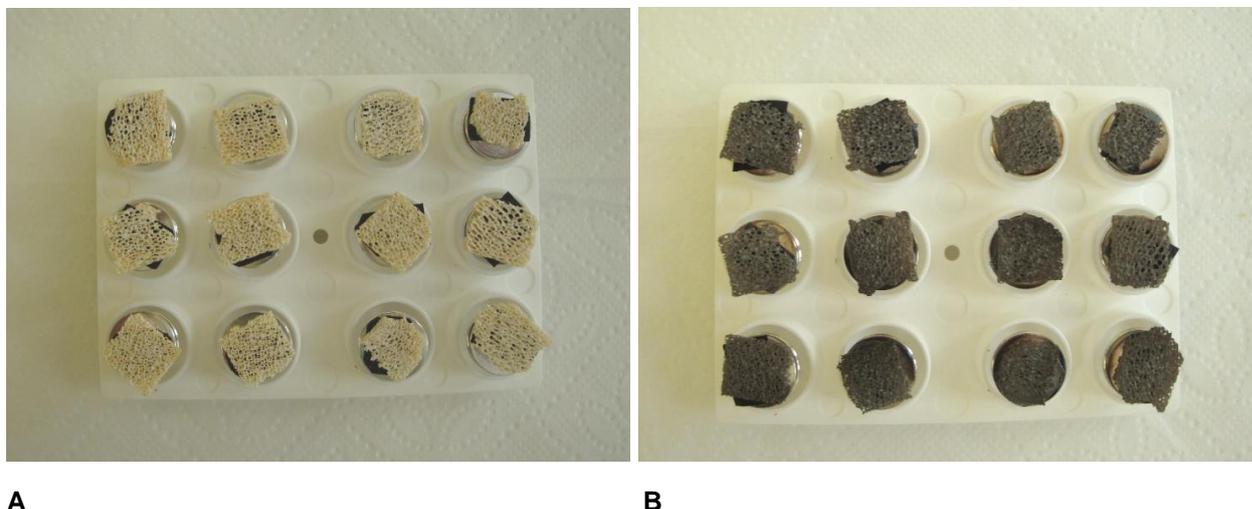
Uma amostra de cada grupo foi preparada para ser avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS.

Primeiramente, o meio de cultura foi retirado e as amostras fixadas com 2,5% glutaraldeído e incubadas a 4°C por uma semana. Após a fixação, o material foi lavado por três vezes com solução tampão fosfato 0,2 M e H<sub>2</sub>O destilada em uma proporção de 1:1. As amostras foram desidratadas de maneira lenta e gradual em banhos seriados de acetona de 30% a 100%. As amostras foram levadas para o aparelho de Ponto Crítico (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer). Após a realização do Ponto Crítico, as amostras foram colocadas em suportes metálicos (“stubs”) e receberam a aplicação de uma camada fina de ouro e carbono para tornar o material condutivo (Figura 12).

A seguir, foi realizada a análise da superfície dos arca-bouços de osso bovino liofilizado de uma amostra de cada grupo com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6060 do CME da UFRGS, em 20.0 kW. Os aumentos empregados foram de: 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x. As imagens foram capturadas

---

pelo próprio pesquisador em diferentes regiões da superfície dos blocos para a avaliação das características morfológicas e estruturais das células aderidas sobre os arcabouços.



**Figura 12. A. Amostras de osso bovino liofilizado - OrthoGen® montadas nos suportes metálicos. B. Amostras após sofrerem a metalização com ouro e carbono.**

#### 4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste trabalho foi realizada através de estatísticas descritivas (média e desvio-padrão) e testes paramétricos.

Os dados da avaliação da densidade populacional por meio da detecção da coloração nuclear pelo DAPI foram organizados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) com dois fatores (*two way*: grupo e tempo), seguida do Teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

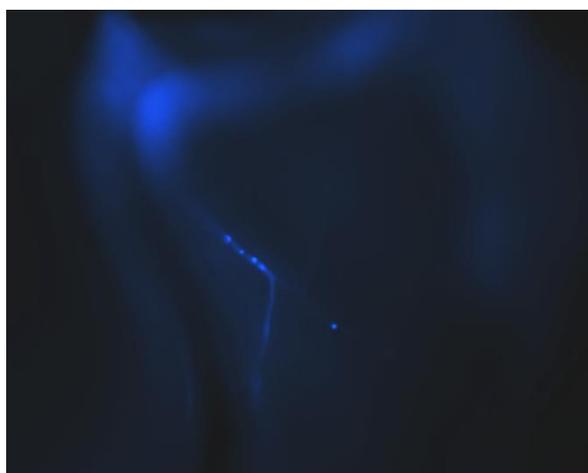
Para o processamento e análise destes dados foi o software utilizado foi o SPSS versão 17.0, tendo-se adotado como nível de significância máximo de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

---

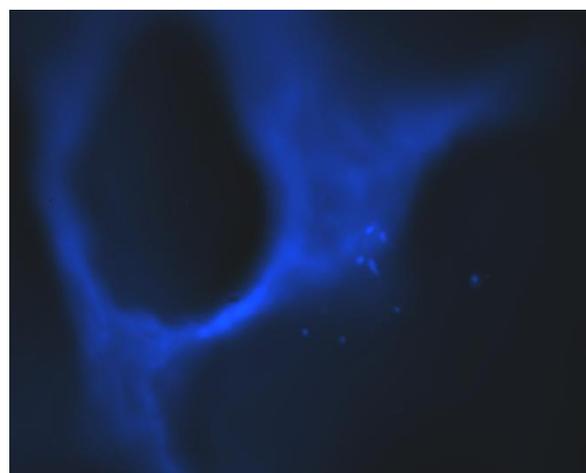
## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE POPULACIONAL

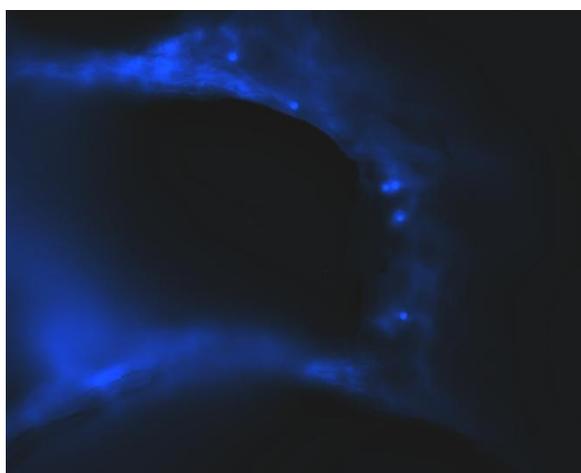
No grupo 1, as médias dos números de núcleos quantificados nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h corresponderam a 5,6 (EP=8,34), 7,4 (EP=8,34) e 6,0 (EP=8,34); respectivamente.



**Figura 13.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 72 h).



**Figura 14.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 96 h).



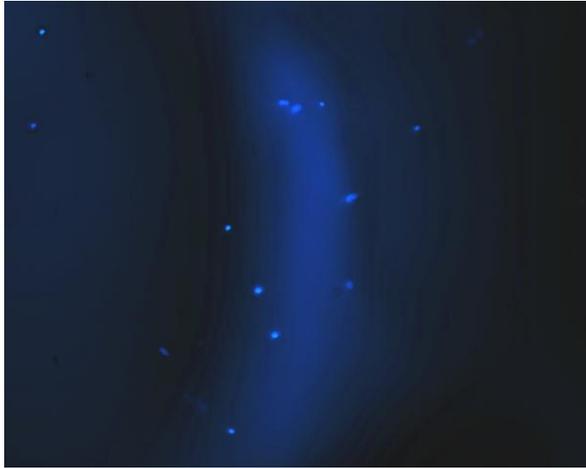
**Figura 15.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 1, 192 h).

---

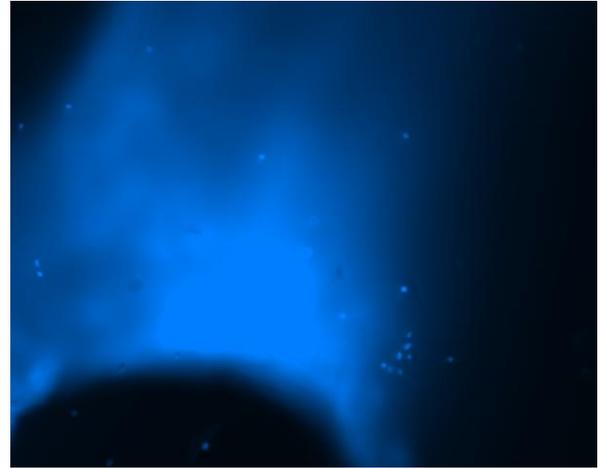
## Resultados

---

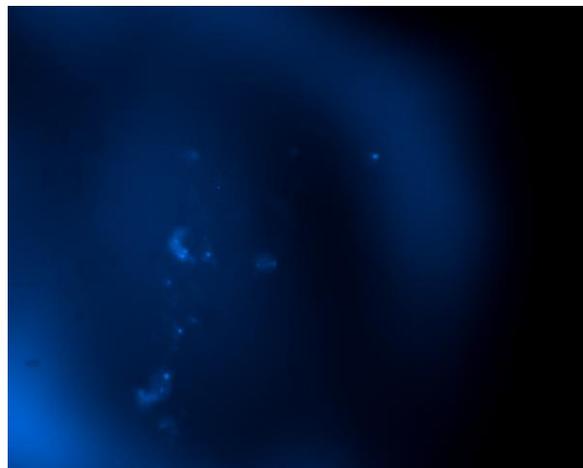
No grupo 2, as médias dos números de núcleos quantificados nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h corresponderam a 13,2 (EP= 5,62), 19,1 (EP= 5,90) e 19,1 (EP= 7,05); respectivamente.



**Figura 16.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 72 h).



**Figura 17.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 96 h).



**Figura 18.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear associadas a PRP aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 2, 192 h).

---

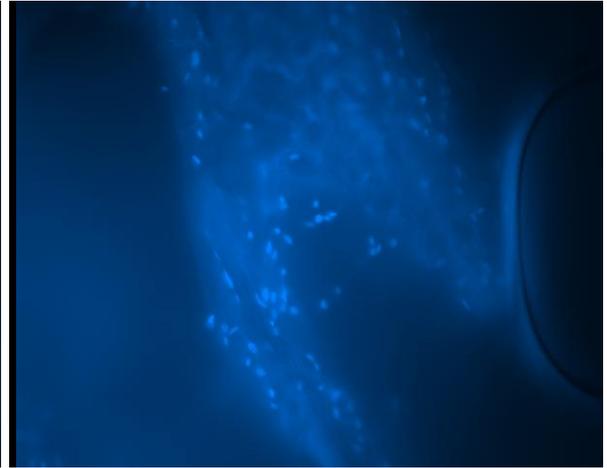
## Resultados

---

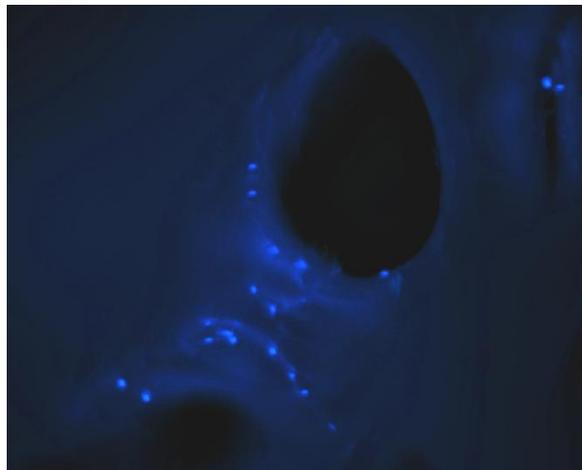
No grupo 3, as médias dos números de núcleos quantificados nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h corresponderam a 16,0 (EP=7,61), 80,9 (EP= 5,62) e 16,4 (EP=7,05); respectivamente.



**Figura 19.** Fotomicrografia de fibroblastos *NIH 3T3* aderidos ao osso bovino liofilizado, corados com DAPI - 100 x (Grupo 3, 72 h).



**Figura 20.** Fotomicrografia de fibroblastos *NIH 3T3* aderidos ao osso bovino liofilizado, corados com DAPI - 100 x (Grupo 3, 96 h).



**Figura 21.** Fotomicrografia de células de fibroblastos *NIH 3T3* aderidos ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 3, 192 h).

---

## Resultados

---

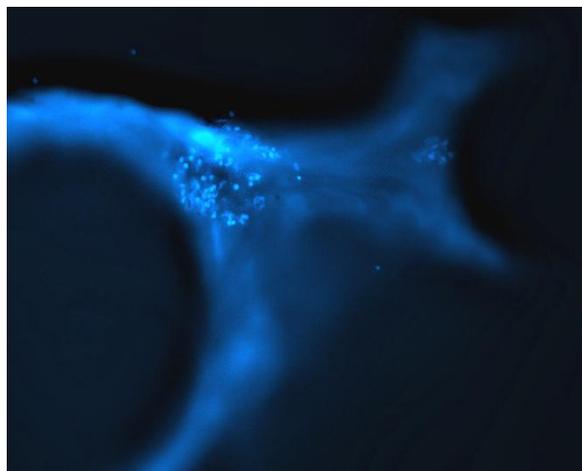
No grupo 4, as médias dos números de núcleos quantificados nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h corresponderam a 10,8 (EP=8,34), 19,4 (EP=8,34), e 48,0 (EP=8,34); respectivamente.



**Figura 22.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 72 h).



**Figura 23.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 96 h).



**Figura 24.** Fotomicrografia de células da fração mononuclear ( $15 \times 10^4$ ) aderidas ao osso bovino liofilizado, coradas com DAPI - 100 x (Grupo 4, 192 h).

---

### 5.1.1 Comparação entre os grupos nos diferentes períodos de tempo de cultura

A análise de variância (ANOVA) com dois fatores mostrou interação significativa entre os efeitos principais avaliados: grupo e tempo, com valor de  $p < 0,001$  (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados da Análise de Variância para a quantificação do número de núcleos.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Valor-p	Poder observado
Grupo	10.131,29	3	3.377,10	9,70	<0,001	0,997
Tempo	5.286,16	2	2.643,08	7,59	0,001	0,937
<b>Grupo * Tempo</b>	<b>20.585,92</b>	<b>6</b>	<b>3.430,99</b>	<b>9,86</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>1,000</b>

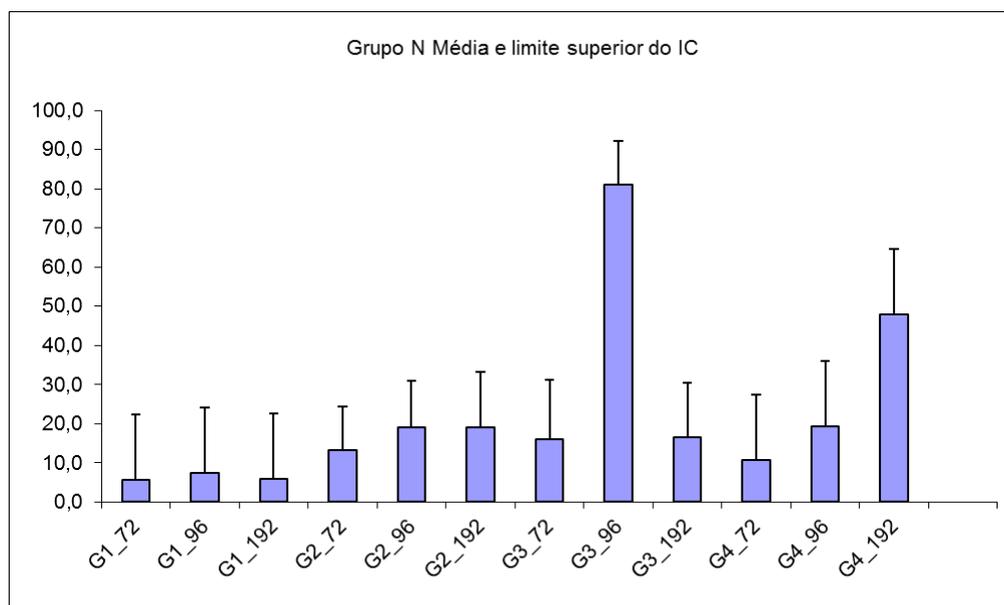
### 5.1.2 Comparações entre os grupos nos diferentes períodos de tempo de cultura conforme teste de bonferroni

A análise do número médio de células aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado de cada grupo, de acordo com o período de tempo avaliado, foi realizada através do Teste de Bonferroni para comparações múltiplas, com um intervalo de confiança de 95% (Tabela 4 e Figura 25).

**Tabela 4.** Resultados da comparação do número de células aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado de cada grupo, nos diferentes períodos de cultura, de acordo com o Teste de Bonferroni.

Grupo	Tempo (h)	n	Média	Erro padrão	Intervalo de confiança - 95%	
					Limite inferior	Limite superior
1	72	5	5,60 <sup>A</sup>	8,34	-11,04	22,24
	96	5	7,40 <sup>A</sup>	8,34	-9,24	24,04
	192	5	6,00 <sup>A</sup>	8,34	-10,64	22,64
2	72	11	13,18 <sup>A</sup>	5,63	1,96	24,40
	96	10	19,10 <sup>A</sup>	5,90	7,33	30,87
	192	7	19,14 <sup>A</sup>	7,05	5,08	33,21
3	72	6	16,00 <sup>B</sup>	7,62	0,81	31,19
	96	11	80,91 <sup>A</sup>	5,63	69,69	92,13
	192	7	16,43 <sup>B</sup>	7,05	2,36	30,49
4	72	5	10,80 <sup>B</sup>	8,34	-5,84	27,44
	96	5	19,40 <sup>AB</sup>	8,34	2,76	36,04
	192	5	48,00 <sup>A</sup>	8,34	31,36	64,64

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.



**Figura 25. Resultados da comparação do número médio de células aderidas ao osso bovino liofilizado de cada grupo, nos diferentes períodos de cultura, de acordo com o Teste de Bonferroni.**

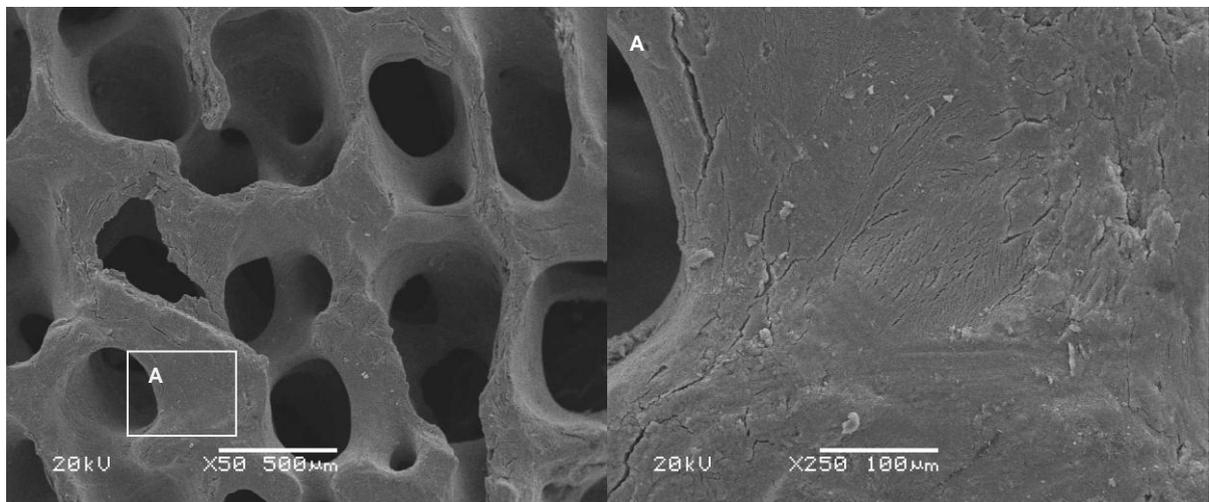
Através dos resultados do teste estatístico de Bonferroni, expressos no intervalo de confiança, verificou-se que nos grupos 1 e 2 não existe diferença significativa entre as médias do número de núcleos quantificados nos três períodos de cultura avaliados. No grupo 3 foi observada diferença significativa de média de núcleos no período de cultura de 96 h, a qual foi maior do que as demais, as médias nos tempos de 72 h e de 192 h não diferiram estatisticamente entre si. No grupo 4 foi observada diferença significativa de média de núcleos no período de cultura de 72 h em relação ao período de 192 h, a média no período de cultura de 96 h, não diferiu estatisticamente dos demais tempos avaliados.

Através dos resultados do teste estatístico de Bonferroni, verificou-se ainda que, no período de cultura de 72 h não se observou diferença significativa entre as médias do número de células aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos grupos estudados. No período de cultura de 96 h observou-se diferença significativa entre as médias de núcleos apenas no grupo 3, a qual foi maior em relação aos demais grupos. No período de cultura de 192 h observou-se diferença significativa entre as médias de núcleos no grupo 4, a qual foi maior em relação aos grupos 1 e 3 neste período de avaliação.

## 5.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

### a) Análise dos grupos 1 e 2:

Nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h, não foram observadas células da fração mononuclear aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado, nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x.

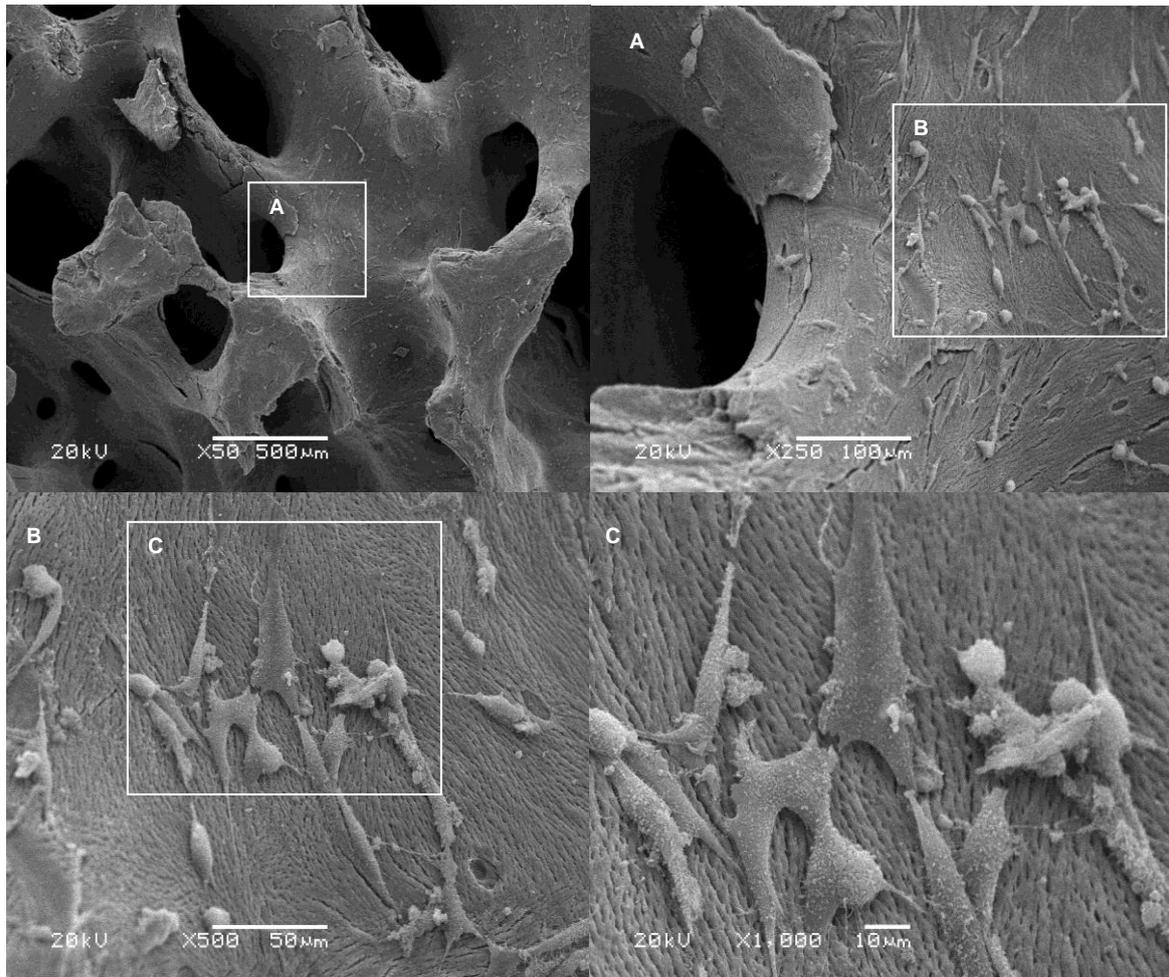


**Figura 26.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO, nos aumentos de 50 x e 250 x (Grupo 1, 96 h).

---

**b) Análise do grupo 3:**

No período de cultura de 72 h, foram observados fibroblastos aderidos ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x.

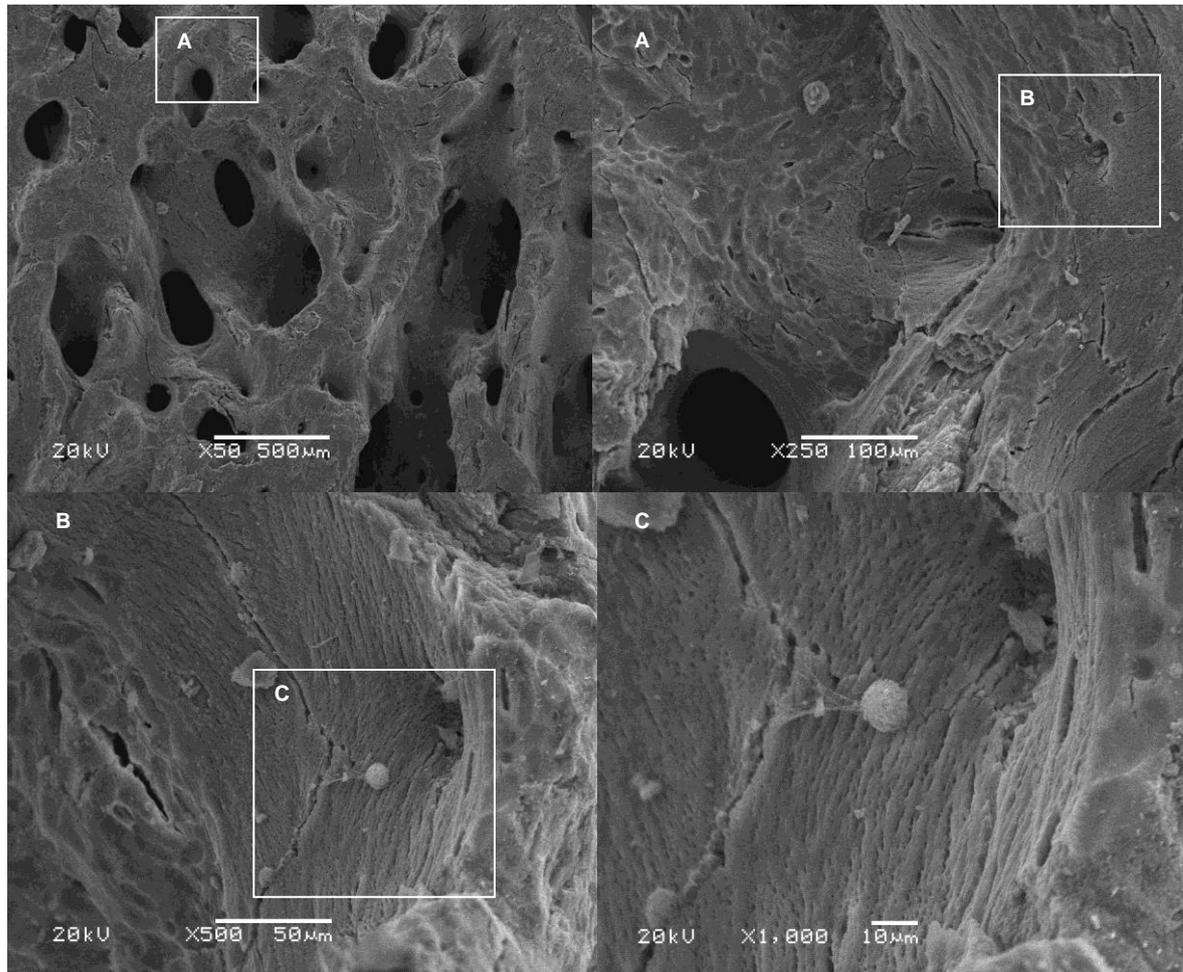


**Figura 27. Fotomicrografias eletrônicas de varredura de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + fibroblastos NIH 3T3, nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 3, 72 h).**

## Resultados

---

No período de cultura de 96 h não foram observados fibroblastos aderidos ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x e 250 x. Nos aumentos de 500 x e 1000 x foram observadas poucas células.



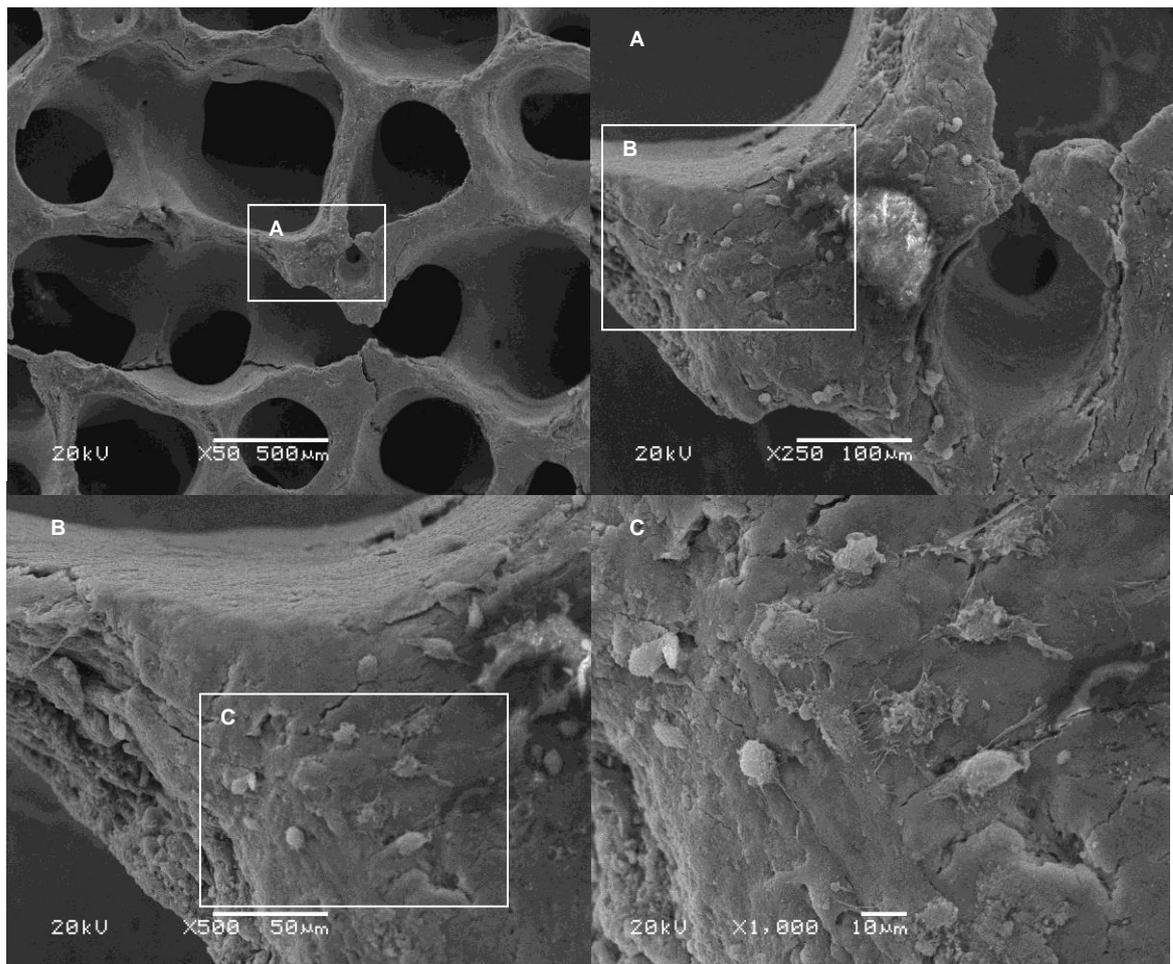
**Figura 28.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + fibroblastos *NIH 3T3*, nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 3, 96 h).

No período de cultura de 192 h não foram observados fibroblastos aderidos ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x.

---

**d) Análise do grupo 4:**

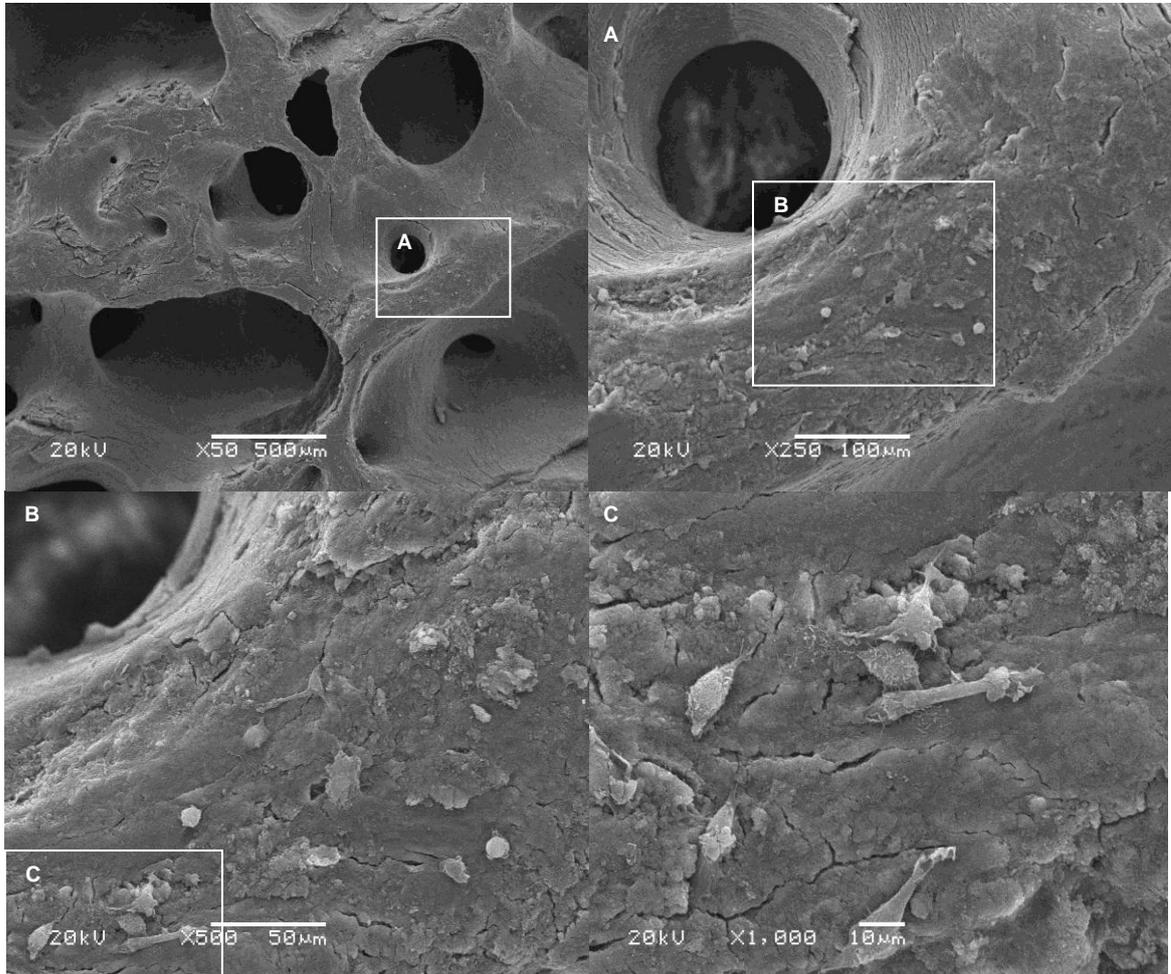
No período de cultura de 72 h foram observadas células da fração mononuclear aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x.



**Figura 29.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 72 h).

## Resultados

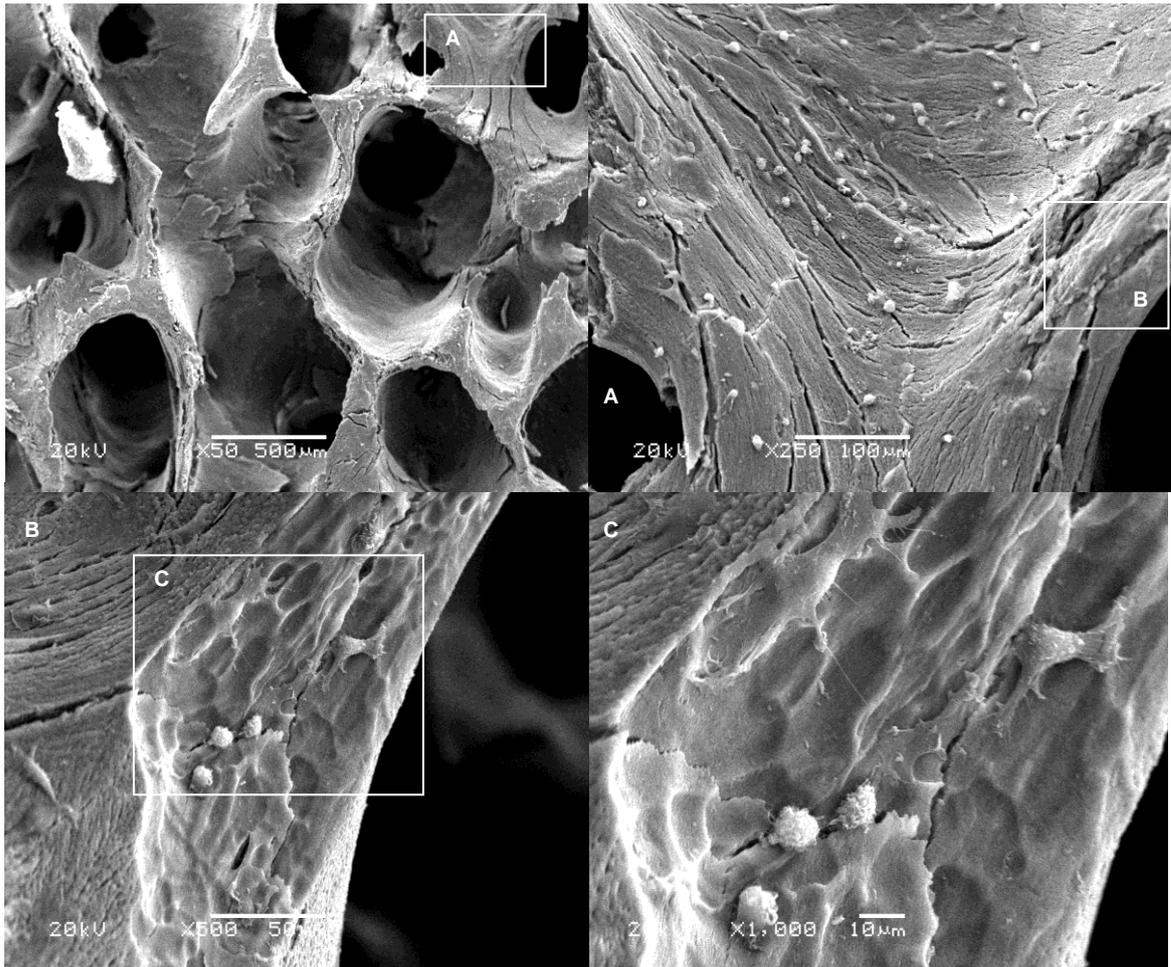
No período de cultura de 96 h foram observadas células da fração mononuclear aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x.



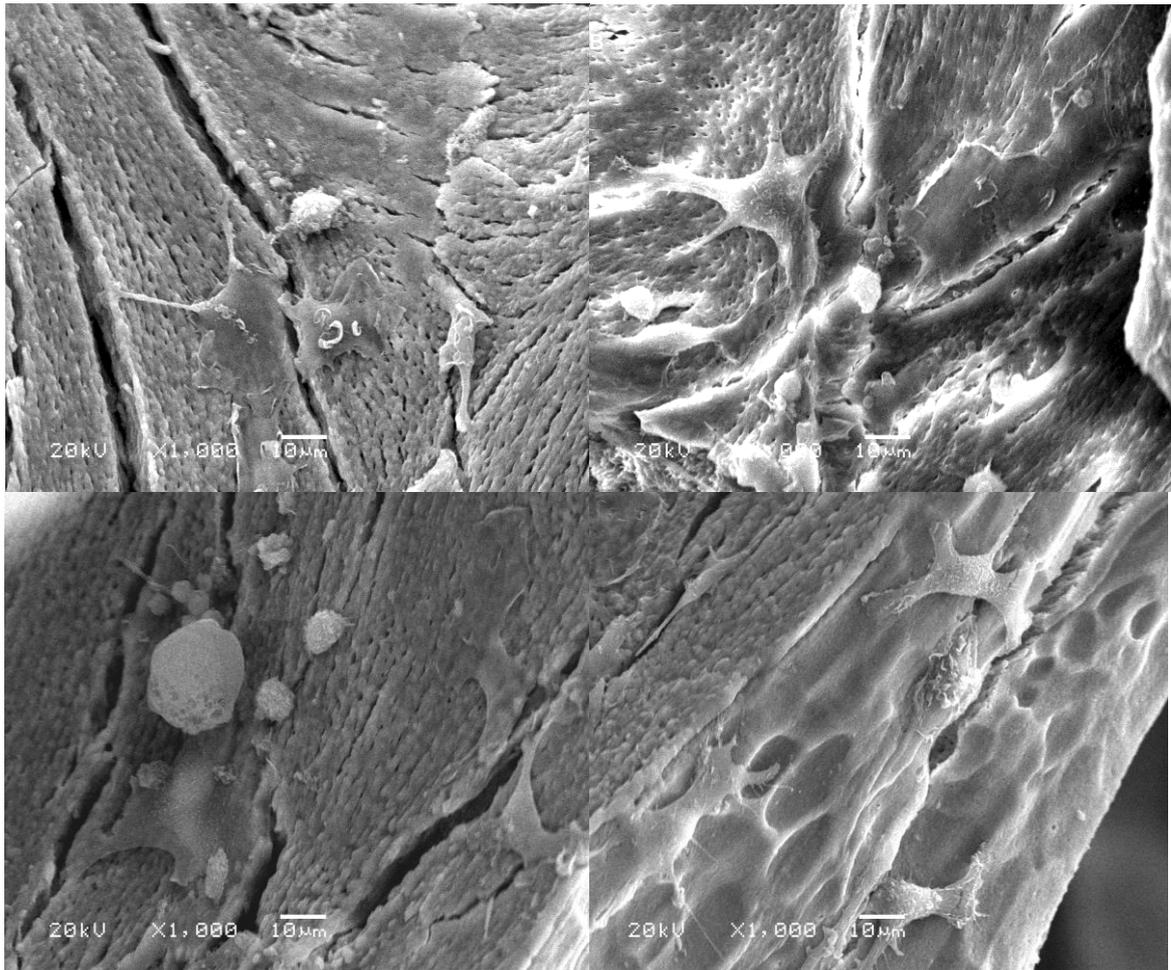
**Figura 30.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 96 h).

## Resultados

No período de cultura de 192 h foram observadas células da fração mononuclear aderidas ao arcabouço de osso bovino liofilizado nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x, já sendo possível evidenciar diferenciação na morfologia celular, visualizando células esféricas e fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos.



**Figura 31.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), nos aumentos de 50 x, 250 x, 500 x e 1000 x (Grupo 4, 192 h).



**Figura 32.** Fotomicrografias eletrônicas de varredura de uma amostra de osso bovino liofilizado + CMMO ( $15 \times 10^4$ ), no aumento de 1000 x, evidenciando as células esféricas e fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos aderidas à superfície óssea (Grupo 4, 192 h).

## 6 DISCUSSÃO

A regeneração óssea vem sendo estudada há décadas, e hoje, culturas de CMIs vem sendo utilizadas nas pesquisas com tecido ósseo, ajudando na compreensão da fisiologia deste tecido e no desenvolvimento de biomateriais. Embora existam células pluripotentes no osso receptor, dependendo do tipo de defeito ocorrido, a adição de células-tronco adultas pode aumentar a possibilidade de sucesso e melhorar a qualidade do osso restaurado.

Neste estudo, foi realizado o cultivo de CMMO sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A), no intuito de avaliar a adesão e a proliferação destas células sobre a sua superfície. Na literatura consultada, outros autores, avaliaram diferentes biomateriais utilizados como arcabouços para o cultivo de CMIs. Fritscher (2007) avaliou o cultivo de CMIs da medula óssea sobre membrana de colágeno bovino e sobre um arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA); Loro (2009) sobre um arcabouço de osso alógeno fresco congelado; Matsushima *et al.* (2009) sobre arcabouços de hidroxiapatita e de  $\beta$ -TCP; Zhang *et al.* (2011) sobre arcabouços de coral natural poroso e Ye *et al.* (2012) sobre cerâmica porosa de beta-fosfato tricálcio. Estes autores demonstraram que estes diferentes biomateriais utilizados como arcabouços, permitiram a adesão, a proliferação e a diferenciação das CMIs<sup>29,32,33,37,51</sup>. Assim como nos trabalhos citados, o arcabouço de osso bovino liofilizado - OrthoGen®, permitiu a adesão e a proliferação de CMMO sobre a sua superfície. A capacidade de diferenciação osteogênica não foi avaliada nesta pesquisa, podendo ser realizada em continuidade a este trabalho. Assim como a implantação ectópica do arcabouço de osso bovino liofilizado semeado com CMIs em estudos em animais, também poderão ser realizados em estudos futuros.

Nesta pesquisa, optou-se pela utilização do osso bovino liofilizado (OrthoGen® - Baumer S.A) como arcabouço para o cultivo de CMMO, uma vez que este enxerto já vem sendo utilizado há alguns anos nas reconstruções ósseas por

---

apresentar estrutura química, características morfológicas e propriedades biomecânicas semelhantes ao tecido ósseo humano, conforme demonstrado por Galia *et al.* em 2009 e 2011. O processo de liofilização e esterilização por radiação gama preserva as características do osso original, a sua estrutura trabeculada e porosa, com tamanho médio dos poros de 316  $\mu\text{m}$ , facilita a deposição de células osteogênicas e a neoformação óssea por osteocondução<sup>13,40</sup>. Pode ser considerado um arcabouço apropriado para a engenharia tecidual óssea por apresentar características fundamentais descritas por diversos autores<sup>5,7,10-13,19,40</sup>.

Assim como relatado por Paris (2004), quando as amostras de osso bovino liofilizado (OrthoGen®) foram colocadas nas placas de cultura com o meio DMEM, foi observada uma alteração de coloração do róseo para o amarelado, indicado pelo vermelho de fenol presente no meio de cultura, demonstrando uma acidez devido à dissolução química da superfície do osso bovino liofilizado, o que poderia inibir a proliferação celular. Devido a este fato, se fez necessário a incubação das amostras em meio DMEM por 72 h na estufa a 37 °C, visando à neutralização do pH do material<sup>28</sup>.

Nas pesquisas descritas na literatura consultada, as CMIs foram cultivadas em diferentes densidades:  $7,2 \times 10^4$  células/ mL (Paris, 2004);  $8 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  células/ mL (Lemos, 2008 e Loro, 2009);  $5 \times 10^6$  células/mL (Beltrão, 2010; Zhang *et al.*, 2011 e Pourebrahim *et al.*, 2012);  $1 \times 10^5$  células/mL (Matsushima *et al.*, 2009 e Fritscher, 2011)<sup>24,28,30,32,33,35,36,51</sup>. Em todos os experimentos foi possível observar adesão e a proliferação das CMI sobre o biomaterial avaliado, como também no presente trabalho.

O presente trabalho foi realizado de acordo com os protocolos para os ensaios *in vitro* do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. As CMMO foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado e semeadas nos arcabouços de osso bovino liofilizado em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/ mL nos grupos 1 e 2 deste estudo, assim como em pesquisas realizadas por Loro, 2002 e Silva-Júnior, 2002; Silva, 2004 e Fritscher, 2007<sup>25-27,29</sup>. No entanto, nas culturas destes grupos, observou-se pequena adesão e proliferação celular nos três períodos de cultura avaliados. Apenas no grupo 3 (controle) foi observada uma maior adesão e proliferação de fibroblastos NIH 3T3, cultivados também nesta densidade. No grupo 4 deste estudo, utilizou-se para os

---

preparos de cultura, uma suspensão de CMMO numa densidade de  $15 \times 10^4$  células / poço, observando-se uma maior adesão e proliferação celular, de forma progressiva, nos três períodos de cultura avaliados.

Observou-se neste estudo que as CMMO de rato Kyoto cultivadas numa densidade de  $15 \times 10^4$  células / poço aderiram e proliferaram de forma significativamente mais evidente quando comparadas às CMMO cultivadas numa densidade de  $5 \times 10^4$  / poço, sugerindo que a maior densidade deve ser utilizada para o cultivo de CMMO em estudos futuros.

Alguns autores indicam a utilização do PRP associado aos enxertos ósseos visando promover uma maior adesão celular e acelerar a proliferação celular e a diferenciação osteogênica<sup>21,44-46</sup>. Fritscher (2007) demonstrou haver uma relação positiva entre a adesão e a proliferação celular com a adição de PRP a CMI's cultivadas sobre membranas de colágeno e de PLGA<sup>29</sup>. Zhang *et al.* (2011) cultivaram CMI's sobre arcaibouços de coral natural poroso associadas a PRP e concluíram que a associação de PRP a CMI's poderia melhorar a atividade da fosfatase alcalina e aumentar formação óssea ectópica<sup>51</sup>. O protocolo adotado neste estudo para a obtenção do PRP foi o descrito por Rossi *et al.* (2004) por ser simplificado e de fácil reprodução clínica<sup>49</sup>. Foi possível verificar que a associação do PRP à suspensão de CMMO utilizada no grupo 2, promoveu uma maior adesão e proliferação celular, no entanto, não de forma estatisticamente significativa.

Nesta pesquisa a fibronectina foi aplicada à superfície do OrthoGen® em uma concentração de 1 µg/mL, visando melhorar a adesão celular à superfície óssea. Esta proteína adesiva tem sido utilizada em ensaios *in vitro*, recobrando a superfície de diversos tipos de biomateriais, como um dos métodos de bioativação de materiais regenerativos, permitindo a interação específica com receptores celulares e promovendo uma maior adesão celular. A modificação das superfícies de biomateriais tem sido proposta a fim de melhorar os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celular. O método de imobilização de biomoléculas da matriz extracelular, como a fibronectina, tem sido utilizado na produção de materiais bioativos<sup>14,52-58</sup>.

Os estudos *in vitro* de Mendonça *et al.* (2009) e Linsley *et al.* (2013) utilizando a fibronectina na cultura de CMI's e na diferenciação em osteoblastos em uma concentração de 10 µg/mL. No presente estudo, apesar de ter sido utilizada

---

uma concentração menor de fibronectina sobre os arcabouços de osso bovino liofilizado (1µg/mL), observou-se adesão e proliferação celular, sendo mais evidente nos grupos 3 e 4, nos períodos de cultura de 72 h, 96 h e 192 h<sup>14,57</sup>.

Através da análise em MEV evidenciou-se a semelhança da estrutura porosa do arcabouço do osso bovino liofilizado (OrthoGen®) com o tecido ósseo trabeculado humano, permitindo a adesão e a proliferação das CMMO. Foram observados os aspectos morfológicos e proliferativos destas células, evidenciando-se células esféricas e fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos aderidas à superfície do arcabouço (Figuras 29, 30, 31 e 32). Os resultados obtidos através da associação de CMMO ao arcabouço osso bovino liofilizado, confirmam as citações de Meyer *et al.* (2004), Wiesmann *et al.* (2004), Marolt *et al.* (2010), Khaled *et al.* (2011) Szpalski *et al.* (2012) e Tabatabaei *et al.* (2012), que enfatizam a necessidade do arcabouço ideal apresentar morfologia, composição química e propriedades biomecânicas semelhantes às da área receptora, fornecer osteocondutividade, não ser tóxico, ser biodegradável e possibilitar a sua integração ao tecido adjacente<sup>5,7,10-12,19,20</sup>.

A análise pelo MEV não demonstrou a adesão e proliferação celular ocorrida nos grupos 1 e 2, em nenhum dos períodos avaliados, apesar da análise através da coloração nuclear pelo DAPI ter demonstrado uma pequena adesão e proliferação e celular, semelhantes nos três períodos de cultura avaliados. Assim como a análise pelo MEV não demonstrou a adesão e proliferação celular ocorrida no grupo 3 no período de 96 h, onde houve a maior quantidade de núcleos marcados pelo DAPI, e também no período de 192 h. Deve-se ser considerado que na avaliação pelo DAPI foram analisadas 2 amostras de cada grupo, e na análise pelo MEV apenas uma amostra de cada grupo foi avaliada.

Em revisão sistemática realizada por Tabatabaei *et al.* (2012) sobre arcabouços utilizados associados a CMI's para as reconstruções maxilares, os autores ressaltaram que os melhores resultados foram obtidos quando foram utilizados arcabouços de coral, seguido dos biomateriais compostos. Concluírem que, até o presente momento, o arcabouço ideal, que atenda a todos os critérios para a engenharia tecidual óssea ainda não foi encontrado<sup>12</sup>. Os resultados obtidos na presente pesquisa mostram que o osso bovino liofilizado (OrthoGen®) permite a adesão e a proliferação das CMMO sobre a sua superfície devido à semelhança da

---

sua estrutura química (mineral-colagenosa) e física (porosa trabeculada) com o osso natural, o que favorece a deposição e população de células com potencial osteogênico e formação de osso novo, conforme descrito por Galia *et al.* (2009)<sup>13</sup>.

A associação de CMMO ao osso bovino liofilizado - OrthoGen® poderia contribuir para otimizar o potencial osteogênico e osteoindutor deste enxerto. Estudos *in vitro* da associação de células mesenquimais e de células mesenquimais osteodiferenciadas a um arcabouço osso bovino liofilizado - OrthoGen® poderão ser realizados em continuidade a este trabalho.

As análises iniciais da associação de CMMO ao osso bovino liofilizado - OrthoGen® sugerem que este enxerto apresenta um potencial para o estabelecimento de novas técnicas terapêuticas para o reparo de perdas ósseas. Os resultados desta pesquisa devem ser somados a outros que se seguem, visando compreender claramente o comportamento celular frente às superfícies dos biomateriais. Sendo assim, o presente estudo contribui para o desenvolvimento de novas tecnologias visando melhorar as reconstruções ósseas.

Visando facilitar o desenvolvimento das pesquisas em engenharia tecidual óssea, o estabelecimento de protocolos para os ensaios *in vitro* com o cultivo de CMI's se faz necessário, com determinação das características do meio de cultura, da densidade celular ideal e dos períodos de avaliação da cultura. Assim como a definição do tipo de tratamento de superfície dos diversos biomateriais utilizados como arcabouços e do protocolo para a associação de fatores de crescimento (PRP).

---

## 7 CONCLUSÕES

Baseados nos objetivos propostos, na metodologia empregada e nos resultados obtidos, concluiu-se que:

7.1 As CMMO cultivadas sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado (OrthoGen®- Baumer S.A., BR) recoberto com fibronectina, aderiram e proliferaram sobre a superfície óssea.

7.2 As CMMO cultivadas sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado numa densidade  $15 \times 10^4$  células / poço, aderiram e proliferaram sobre a superfície óssea de forma mais evidente, quando comparadas às CMMO cultivadas numa densidade  $5 \times 10^4$  células / poço, nos três períodos de cultura avaliados.

7.3 A associação de PRP à cultura de CMMO sobre um arcabouço de osso bovino liofilizado aumentou, mas não de forma estatisticamente significativa, a adesão e a proliferação celular sobre a superfície óssea.

---

**8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Granjeiro RC, Souza BGS, Antebi U, Honda EK, Guimarães RP, Keiske N, *et al.* Aspectos da distribuição de tecidos músculo-esqueléticos de um banco de tecidos. *Acta Ortop Bras.* 2009;17(6):336-9.
  2. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol.* 2010;85(5):647-56.
  3. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
  4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 84(5411):143-7.
  5. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(6):523-30.
  6. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.* 2009;51(1):25-41.
  7. Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010:1-10.
  8. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: Bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Trans Med.* 2012;1:403-8.
  9. Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, Muller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, *et al.* Control of *in vitro* tissue engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials.* 2007;28:1152-62.
  10. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(4):325-32.
  11. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(7):635-41.
  12. Tabatabaei FS, Motamedian SR, Gholipour F, Khosraviani K, Khojasteh A. Craniomaxillofacial bone engineering by scaffolds loaded with stem cells: a systematic review. *J Dent Sch.* 2012;30(2):115-31.
-

13. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Diesel, Moreira L F. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2009;36(2):157-60.
  14. Mendonça RH, Thiré RM, Costa MF, Filho FC. Adsorção de fibronectina a arcabouços de polihidroxibutirato aplicáveis à engenharia óssea. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2009;19(2):143-8.
  15. Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida A, Santos JD. Substitutos ósseos - conceitos gerais e estado actual. *Arqui Med.* 2006;19(4):153-62.
  16. Crha M, Nečas A, Srnec R, Janovec J, Stehlík L, Raušer P, *et al.* Mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration and application to bone healing. *Acta Vet Brno.* 2009;78: 635-42.
  17. Kaveh K, Ibrahim R, Abu Bakar MZ, Ibrahim TA. Bone grafting and bone graft substitute. *J. Anim. Vet. Adv.* 2010;9(6):1055-67.
  18. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006;35:232-42.
  19. Khaled EG, Saleh M, Hindocha S, Griffin M, Khan WS. Tissue engineering for bone production-stem cells, gene therapy and scaffolds. *Open Orthop J.* 2011; 5(2):289-95.
  20. Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM. Bone Tissue engineering: current strategies and techniques - part I: scaffolds. *Tissue Eng Pt B-Rev.* 2012;18(4):246-57.
  21. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials.* 2008;29:3983-92.
  22. Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen Med.* 2006;1(4):589-604.
  23. Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone tissue engineering: current strategies and techniques - part II: cell types. *Tissue Eng Pt B-Rev.* 2012;18(4):258-69.
  24. Pourebrahim N, Hashemibeni B, Shahnaseri S, Torabinia N, Mousavi B, Adibi S, *et al.* A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42:562-8.
  25. Loro RCD. Estudo in vitro da osteoindução de células da medula óssea humana. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2002.
-

26. Silva Júnior. A. 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]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2003.
  27. Silva T. Efeito da rugosidade de superfícies de discos de titânio sobre proliferação e diferenciação de células de medula óssea humanas. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2004.
  28. Paris M F. Avaliação da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de hidroxiapatita e titânio. [Tese]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2004.
  29. Fritscher GG. Cultivo de células da medula óssea humana sobre membranas de colágeno bovino e arcabouços de ácido poliglicólico polilático (PLGA). [Dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2007.
  30. Lemos MA. Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2008.
  31. Eniwumide JO, Yuan H, Cartmell SH, Meijer GJ, Bruijn JD. Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft. *Eur Cells Mater.* 2007;14:30- 9.
  32. Loro RCD. O papel de um arcabouço de osso alógeno e de um meio de cultura na osteogênese de células tronco adultas da medula óssea humana. [Tese]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2009.
  33. Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, Kawate K, Yajima H, Takakura Y, *et al.* *In vivo* osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Artif Organs.* 2009;33(6):474-81.
  34. Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, *et al.* Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(3):201-9.
  35. Beltrão RG. Análise da diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio. [Tese]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2009.
  36. Fritscher GG. Avaliação da influência de células mononucleares de medula óssea no reparo ósseo de ratos [Tese]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2011.
  37. Ye X, Yin X, Yang D, Tan J, Liu G. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Tissue Eng Pt C.* 2012;18(7):545-56.
-

38. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LMAQ, Moreira LF. *In vitro* and *in vivo* evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. *Clinics*. 2008;63(6):801-6.
  39. Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop*. 1996;20:142-6.
  40. Galia CR, Lourenço AL, Rosito R, Macedo CAS, Camargo LMAQ. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(4):444-51.
  41. Encarnação IC, Bullen CEM, Luna MDP, Pereira Neto ARL, Cordero EB, Magini RS. Aumento horizontal com osso xenógeno em bloco: alternativa viável ao uso do ósseo autógeno. *Revista Implantnews*. 2011;8(2):201-5.
  42. Sauerbier S, Stubbe K, Maglione M, Haberstroh J, Kuschnierz J, Oshima T, *et al*. Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures - an experimental study in sheep. *Tissue Eng Pt C*. 2010;16(5):1033-9.
  43. Zhao J, Yang C, Su C, Yu M, Zhang X, Huang S, *et al*. Reconstruction of orbital defects by implantation of antigen-free bovine cancellous bone scaffold combined with bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251:1325-33.
  44. Marx K, Garg AK. Dental and craniofacial applications of platelets rich plasma. 1ª ed. Illinois: Quintessence Books; 2005.
  45. Wroblewski AP, Mejia HA, Wright VJ. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop*. 2010;20:98-105.
  46. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Ageing*. 2013;10-23.
  47. Dusse LMS, Macedo AP, Batschauer AP, Carvalho MG. Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. *RBAC*. 2008;40(3):193-7.
  48. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*. 2009;30:4956-66.
  49. Rossi Júnior R, e Souza Filho MAP. Obtenção de trombina autógena – proposta de um protocolo simplificado e de fácil reprodução clínica. *Rev. Paul. Odontol*. 2004;5:4-9.
  50. Rossi Júnior R, Negreiros RM, Elias FM, Jorge WA. Utilização de plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*. 2008;20(3):295-300.
-

51. Zhang S, Mao T, Chen F. Influence of platelet-rich plasma on ectopic bone formation of bone marrow stromal cells in porous coral. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011;40:961-5.
  52. Sevilla CA, Dalecki D, Hocking DC. Extracellular matrix fibronectin stimulates the self-assembly of microtissues on native collagen gels. *Tissue Eng Pt A.* 2010; 16(12):3805-19.
  53. Bruckner-Tuderman L, von der Mark K, Pihlajaniemi T, Unsicker K. Cell interactions with the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010;339:1-5.
  54. Von der Mark K, Jung P, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2010;339: 131-53.
  55. Stoffels JMJ, Zhao C, Baron W. Fibronectin in tissue regeneration: timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70:4243-53.
  56. Kuzmenko V, Sämfors S, Hägg D, Gatenholm P. Universal method for protein bioconjugation with nanocellulose scaffolds for increased cell adhesion. *Mater Sci Eng C.* 2013;33:4599-607.
  57. Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts. *Tissue Eng Pt A.* 2013;19(11 and 12):1416-23.
  58. Zhang Y, Chai C, Jiang XS, Teoh SH, Leon KW. Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET. *Mater Sci Eng C.* 2007;27:213-9.
  59. Fleiss JL. *The design and analysis of clinical experiments.* New York: John Wiley & Sons; 1986. Citado em: Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. *Epidemiologia e estatística na pesquisa odontológica. Edição revisada e ampliada.* São Paulo: Atheneu; 2005.
-

**ANEXOS**

---

---

**ANEXO A - APROVAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA**

*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

**Porto Alegre 26 de abril de 2012**

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0021/12

**Intitulado:** Análise da associação de células-tronco mesenquimais e fração mononuclear de medula óssea a um enxerto ósseo bovino liofilizado.

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Cláiton Heitz

**Pesquisadores Associados:** Rosana Kalaoun

**Nível:** Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 26 de abril de 2012.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS.*

**Profa. Dra. Ana Maria Spohr**  
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B - APROVAÇÃO CEUA**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 079/12 – CEUA

Porto Alegre, 15 de junho de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00285, intitulado: **“Análise da associação de células-tronco mesenquimais e fração mononuclear de medula óssea a um enxerto ósseo bovino liofilizado”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez  
Coordenador - Adjunto da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Claiton Heitz  
Faculdade de Odontologia  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

**ANEXO C - TESTE DE REPLICABILIDADE PARA A QUANTIFICAÇÃO NUCLEAR DAS AMOSTRAS.**

The screenshot shows a software window titled "Correlação Intraclasse" with a standard Windows interface (minimize, maximize, close buttons). The window contains a form with the following fields and values:

Imprimir	
Variância entre os	Erro experimental
0.6262	0.0004
GL1	GL2
9	10
F	p-valor
1782.4163	p < 0.0001
Correlação Intraclasse	
0.9989	
IC 95% Lim. Inferior	IC 95% Lim. Superior
0.9951	0.9997
Conclusão segundo Fleiss, J. L. (1986)	
Replicabilidade Excelente	

O Índice de Correlação Intraclasse (ICC) obtido foi de 0,99, considerado excelente para a replicabilidade, segundo FLEISS (1986).

---