



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE

ESTUDO DA CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DO VITROCERÂMICO ANORTITA
EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

CURITIBA

2010

JÔNATAS ARACY GOMES DE SOUSA

**ESTUDO DA CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DO VITROCERÂMICO ANORTITA
EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Beatriz Luci Fernandes

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

JÔNATAS ARACY GOMES DE SOUSA

ESTUDO DA CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DO VITROCERÂMICO ANORTITA EM CULTURA DE CÉLULASTRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Nome do professor
Instituição

Nome do professor
Instituição

Nome do professor
Instituição

Curitiba, 29 de junho de 2010.

Aos amados Afonso de Sousa e Dalva Soares Gomes de Sousa, pais exemplares que me apresentaram com todo o carinho ao mundo e que nortearam a minha caminhada na estrada da vida.

Com muito carinho à Ana Cristina, mãe dos meus filhos Ana Clara e João Vitor, pelo conforto e alegria nos momentos mais importantes.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À minha amável e única irmã Estefânia Gomes de Sousa;

À minha querida orientadora Dra. Beatriz Luci Fernandes pela confiança, paciência, fonte de luz e de inesgotável sabedoria e conhecimento;

Ao Dr. Paulo Roberto Slud Brofman pela oportunidade

À Dra. Dorly de Freitas Buchi, professora do Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas – Departamento de Biologia Celular da UFPR, pelo imenso incentivo e acolhimento;

À Dra. Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto pela visão privilegiada da pesquisa e pela irretocável técnica desempenhada diariamente nas bancadas do laboratório;

À Dra. Simone Martins de Oliveira pela atenção, carinho, incentivo e apoio irrestrito;

Ao Carlos Fernandes pela grande ajuda;

Ao mestre José Nogueira Athayde, por quem estimo imenso apreço e admiração;

À mestre Cristina Maria Rocha Dutra, colega e amiga fiel de todas as horas;

À secretaria Erli Ivanilde Bianco pelas memoráveis colaborações;

À minha amiga Fabiane Barchiki por todo o apoio nas técnicas laboratoriais da PUC-PR

À Bibliotecária Lucia Littiere pelo apoio,

À madrinha Lindalva Gomes Xavier e ao Padrinho Wilson Gomes Xavier pelo exemplo de amor e família;

Ao meu tio Afonso Soares pelo exemplo de vida e intelectualidade;

Ao Setor de Microscopia Eletrônica da UFPR,

Ao Laboratório de Transplante Celular da PUC-PR

Ao Laboratório de Biologia Celular da UFPR, em especial à Dra Dorly, Dra. Simone e Dra Ana Paula,

À Dra Ulysséia Menezes da Costa, minha chefe, mãe paranaense e incentivadora;

Ao amigo e companheiro, o nutricionista Lucas Gossling e família;

À Professora Dra. Márcia Olandosky, pela imensa contribuição;

E a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e ajudaram.

“ [...] queremos mais uma vez reafirmar o nosso desejo de reunir, numa obra afirmativa da força e do poder criador da nacionalidade brasileira, todos os homens de boa vontade, todos aqueles que colocam alto o interesse da pátria, tão necessitada, nesta hora, de desvelo, de cuidado e de trabalho, sentimo-nos mais do que nunca animados do ardente desejo de trabalharmos incansavelmente pela paz da família brasileira. Pedimos a Deus que nos inspire e nos dê o sentimento da grandeza de nossa missão.”

Juscelino Kubitschek de Oliveira

RESUMO

Enxertos ósseos são inseridos em locais onde ocorreram perdas de massa óssea para servirem como ponte para o crescimento de tecido novo. Embora os tipos de enxerto mais usados sejam o autógeno e o alógeno, registros clínicos mostram complicações tanto no período operatório como no pós operatório que causam sérios danos à saúde do paciente, retardando a sua reabilitação. Por isso, muitas pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de biomateriais sintéticos adequados para serem utilizados como enxertos ósseos. O vitrocerâmico de Anortita (MU8702682-1), biomaterial proposto para uso como enxerto ósseo, contém elementos químicos em sua composição encontrados em muitos biomateriais utilizados atualmente. A matéria prima do vitrocerâmico é de baixo custo, assim como o seu processo de fabricação. Em trabalhos anteriores, ensaios *in vitro* comprovaram a sua tendência em degradar em meio ácido e a sua capacidade de permitir a adesão e o crescimento celular sendo considerado, portanto, um material atóxico. Um estudo *in vivo* (Parecer n.07/05/CEPA), realizado com implantação em coelhos, constatou a sua biocompatibilidade. Com base nos resultados destes estudos, a fim de avaliar a sua capacidade osteoindutora, o presente trabalho contemplou o cultivo, sobre o biomaterial (BIO), de células tronco mesenquimais humanas (CTM) retiradas da medula óssea de três voluntários (Parecer n. 0002571/09/CEP), utilizando protocolo pré definido. As células foram isoladas, expandidas e, após confluência de 80%, cultivadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura DMEM acrescido de: BIO apenas, BIO+CTM, BIO+CTM+meio de diferenciação (MD), BIO+MD, CTM apenas, CTM+MD. As análises realizadas nos conteúdos dos poços foram Atividade da Fosfatase Alcalina (FAO), Citoquímica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) realizadas nos dias 1 (somente FAO), 7, 14 e 21. Os resultados da FAO sugeriram que o biomaterial conseguiu induzir a diferenciação e a proliferação celular, sem a necessidade da adição do MD. A osteoindução pode ser verificada pela mineralização ocorrida principalmente no 21º dia de cultivo, visualizada nas imagens do MEV, considerada como evidência definitiva do potencial osteogênico do biomaterial. Através dos resultados da citoquímica, foi possível confirmar a capacidade de diferenciação das CTMs em osteoblastos em presença de MD, sugerindo que a diferenciação das CTMs em osteoblastos na presença da Anortita foi consequência apenas desta. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que ocorreu adesão celular sobre o biomaterial e sugerir fortemente que o mesmo induziu a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos, mesmo sem a presença do meio de diferenciação, comprovando sua capacidade osteoindutora.

Palavras chave: Osteogênese. Materiais biocompatíveis. Células tronco.

ABSTRACT

Bone grafts are inserted in sites where loss of bone mass occurred in order to provide a bridge for growing new tissue. Although the autografts and allografts are most commonly grafts used types, clinical records attest complications during the surgery procedure as well as the post surgery period that cause serious damage to the patient's health retarding his rehabilitation. Therefore, many researchers have been directed to the development of artificial biomaterials suitable for use as bone grafts. The glassceramic Anorthite (MU8702682-1), biomaterial proposed for use as bone graft, contains chemical elements in its composition which are found in many biomaterials currently in use. The raw material of the glassceramic is low cost as well as its manufacturing process. In earlier studies, in vitro tests have proven its tendency in degrade in acid environment and its capacity of cellular adhesion and growth being considered, therefore, non toxic material. An in vivo test (Protocol n.07/05/CEPA) performed in rabbits demonstrates its biocompatibility. Based on the results from these studies, in order to assess its osteoinductive capability, the present work contemplate the cultivation, over the biomaterial (BIO), of human mesenchymal stem cells (MSC) obtained from the bone marrow of three volunteers (Protocol n. 0002571/09/CEP) using predefined protocol. The cells were isolated, expanded and, after 80% confluence was achieved, were cultivate in plates of 24 wells containing culture medium DMEM with: BIO only, BIO+MSC, BIO+MSC+ differentiation medium (MD), BIO+MD, MSC only, MSC+MD. The analysis carried out in the wells content were Alkaline Phosphatase Activity (FAO), cytochemistry and Scanning Electron Microscopy (SEM) performed on days 1(only FAO), 7, 14 and 21. The results from the FAO show that the biomaterial was able to induce the cell differentiation and proliferation without the need for addition of MD. The osteoinduction could be verified by mineralization occurred mainly on the 21st day of cultivation, visualized on the SEM images, considered as definitive evidence of osteogenic potential of the biomaterial. Through cytochemistry results it was possible to confirm the MSCs osteoblast differentiation capacity in presence of MD and suggested that the MSCs osteoblast differentiation in presence of Anorthite was consequence only of it. Based on the results obtained is possible to conclude that cellular adhesion occurred on the biomaterial and strongly suggest that the biomaterial induced differentiation of the mesenchymal stem cells in osteoblasts, even without the MD, proving its osteoinduction capacity.

Key words: Osteogenesis. Biocompatible materials. Stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de enxerto sendo inserido em um grande defeito ósseo....	17
Figura 2. Retirada de um enxerto autógeno da crista ilíaca.....	18
Figura 3. Enxerto alógeno proveniente de cadáver humano.....	19
Figura 4. Enxerto sintético (aloplástico) confeccionado em material polimérico.	20
Figura 5. Mistura de pós em cadinho de alumina sobre balança (IGCB).	28
Figura 6. Processo de fabricação das amostras, usando um forno de 1600oC: (a) abertura do forno para a retirada do material fundido, (b) vazamento do material fundido sobre a matriz aquecida e (c) prensagem manual do material fundido para a conformação da pastilha vítrea.	29
Figura 7. Pastilha de Anortita na fase vítrea 1:1.....	30
Figura 8. Parte da pastilha cristalizada 1:1.	30
Figura 9. Medula óssea diluída em meio de cultura sobre a solução de Ficoll- Hypaque.	31
Figura 10. Anel de células mononucleares (seta) após a centrifugação com Ficoll-Hypaque.....	32
Figura 11. Microscópio Óptico Invertido usado para a verificação da confluência das células.	33
Figura 12. Confluência de 80% das CTMs observadas em microscópio ótico invertido.	33
Figura 13. Esquema das placas I, II, III, e IV de cada voluntário. BIO = Biomaterial, CTM = Células Tronco Mesenquimais, MD = Meio de diferenciação.	35
Tabela 1. Resultados da FAO (U/I) para os três voluntários nos dias 1, 7, 14 e 21, de acordo com o conteúdo das placas.	40
Figura 14. Valores médios, mínimos e máximos dos três voluntários considerando-se cada amostra em cada dia de avaliação.....	41
Figura 16. Comparação entre as amostras do 7o dia, mostrando a proliferação celular mais acentuada sobre o biomaterial. (a) lâmina de vidro + DMEM, 2.000x	

(b) lâmina de vidro + DMEM, 4.500x (c) BIO + DMEM, 1.000x e (d) BIO + DMEM, 3.000x, mostrando a Anortita sob a camada de células (seta).....48

Figura 17. Comparação entre as amostras do 14o dia, mostrando a proliferação celular mais acentuada sobre o biomaterial e o crescimento de vesículas minerais como as indicadas pelas setas. (a) lâmina de vidro + DMEM, 1.300x (b) lâmina de vidro + DMEM, 7.000x (c) BIO + DMEM, 5.500x e (d) BIO + DMEM, 5.500x.49

Figura 18. Comparação entre as amostras do 21o dia, mostrando a proliferação em várias camadas celulares, em um padrão diferente do crescimento sobre a lâmina. (a) lâmina de vidro + DMEM, 1.800x (b) lâmina de vidro + DMEM, 4.500x (c) BIO + DMEM, 3.000x e (d) BIO + DMEM, 9.000x.....50

Figura 19. Comparação entre as amostras do 21o dia de cultivo sobre a Anortita, mostrando a proliferação celular. (a) BIO + DMEM, 3.000x (b) BIO + DMEM, 9.000x (c) BIO + DMEM + MD, 3.000x e (d) BIO + DMEM + MD, 5.500x...51

Figura 20. Citoquímica das CTMs, cultivadas sobre lamínulas na presença de MD, no 7° (A, B), 14° (C, D) e 21° (E, F) dias. As células controle, cultivadas sem presença de MD estão representadas no canto superior direito. As células foram coradas com o corante Alizarina S, em pH 4,2 (A, C, E) e pH 7,0 (B, D, F), evidenciando cristais de fosfato de cálcio e oxalato e carbonato de cálcio, respectivamente (→). Aumento 400X. Abreviaturas: CTM, células tronco mesenquimais; MD, meio de diferenciação.53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

FAO	fosfatase alcalina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MECs	matrizes extracelulares
CTMs	células-tronco mesenquimais
BMP	proteínas ósseas morfogenéticas
FN	fibronectina
VN	vitronectina
Arg-Gly-Asp	arginina-glicina-aspartato
U/L	unidades por litro
nm	nanômetro
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
SFB	soro fetal bovino
PBS	solução salina tamponada
MD	meio de diferenciação
BIO	biomaterial
$\mu\text{mol/L}$	micromol por litro
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
mmol/L	milimol por litro
μl	microlitro
mL	mililitro
min	minuto
rpm	rotações por minuto
M	molar
h	hora
$\Delta\text{A/min}$	absorbância por minuto
Ca	cálcio
P	fósforo
pH	potencial hidrogeniônico
g	grama
g/cm^3	grama por centímetro cúbico
cm^2	centímetro quadrado
$^{\circ}\text{C}$	graus celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 ENXERTOS ÓSSEOS.....	17
2.2 OSTEOLASTOS	22
2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS	24
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE OSTEOLÁSTICA IN VITRO	26
3 METODOLOGIA	28
3.1 FABRICAÇÃO DAS PEÇAS EM VITROCERÂMICO ANORTITA.....	28
3.2 ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CTMS	30
3.3 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	34
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOGÊNESE	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA (FAO).....	39
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDUTA (MEV).....	44
4.3 CITOQUÍMICA	52
5 CONCLUSÕES	55
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	63
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	63

1 INTRODUÇÃO

Perdas de massa óssea ocasionadas por traumas, fraturas patológicas ou ressecção de tumores apresentam complicações cirúrgicas para o seu reparo e, geralmente, necessitam de inserção de enxertos para uma consolidação adequada (RODRIGUES; MERCADANTE, 2005);(PINHEIRO *et al.*, 2008).

O enxerto ósseo mais usado é o autógeno, retirado do próprio paciente, geralmente, da crista ilíaca. Estudos clínicos, no entanto, têm mostrado que este procedimento provoca alguns problemas como morbidade e dor no local da retirada do enxerto, reabilitação prolongada, risco de infecção, inflamação, complicações vasculares, quantidade restrita de material e reabsorção do tecido no local de enxertia (PINHEIRO *et al.*, 2008);(PORTER *et al.*, 2009).

Alternativas aos enxertos autógenos são os provenientes de banco de ossos que podem ser alógenos, de cadáveres, ou xenógenos, de animais. O sucesso de ambos é dependente da reação do sistema imunológico do hospedeiro que pode levar à rejeição. Além disso, estes enxertos apresentam um grande risco de transmissão de doenças (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008).

Tais evidências motivaram o desenvolvimento de biomateriais adequados para serem utilizados como enxertos ósseos sintéticos os quais devem simular o ambiente físico-químico do osso natural e devem sofrer degradação depois de exercida a função de ancoragem do osso novo sem, no entanto, liberar substâncias potencialmente tóxicas no organismo do hospedeiro (PORTER *et al.*, 2009).

No desenvolvimento destes biomateriais devem ainda ser consideradas duas propriedades importantes: a osteocondução, a qual permite o crescimento ósseo sobre o biomaterial, e a osteoindução que estimula a formação de osso novo (PATEL; CATALANO, 2009); (EAGAN; Mc ALLISTER, 2009); (SOUSA *et al.*, 2008).

Na última década surgiram avanços significativos nas opções de enxertos ósseos sintéticos para as cirurgias ortopédicas, entretanto, atualmente não existem dados disponíveis e nem mesmo consenso quanto ao tipo específico de enxerto a ser utilizado nas diferentes indicações cirúrgicas. No entanto, tem sido observado que as matrizes extracelulares, MECs, tridimensionais são os sistemas mais adequados para esta aplicação (BOSTROM; SEIGERMAN, 2005).

A fim de estimular o crescimento ósseo em MECs porosas biodegradáveis tem sido realizados cultivos de células-tronco sobre as mesmas. Desta forma, os suportes tridimensionais fornecem um apoio importante para a adesão, proliferação e diferenciação celular (ZHANG *et al.*, 2009).

Depois de diferenciados, os osteoblastos penetram nos poros interconectados do biomaterial formando a ponte necessária para a remodelação da alteração óssea (KHONG, 2007). O diâmetro dos poros deve estar entre 100 e 200 µm para que haja o crescimento ósseo, o suprimento de nutrientes e o crescimento de vasos sanguíneos necessários à manutenção do tecido vivo (KHONG, 2007);(JONES *et al.*, 2009).

Devido à fase mineral do osso ser composta por material cerâmico, torna-se importante a procura por materiais cerâmicos sintéticos para a confecção de enxertos ósseos. O vitrocerâmico de Anortita (MU8702682-1), biomaterial proposto para este trabalho, contém silício, alumínio e cálcio em sua composição química, elementos encontrados em muitos biomateriais utilizados atualmente. Para a sua fabricação, uma mistura de óxidos metálicos contendo estes elementos é levada à fusão formando um material vítreo que, através de tratamento térmico adequado, é cristalizado dando origem ao vitrocerâmico, material com resistência mecânica superior ao vidro e à cerâmica.

Em trabalhos anteriores, ensaios *in vitro* com o biomaterial aqui estudado comprovaram sua tendência em se degradar em meio ácido e a sua capacidade de permitir a adesão e o crescimento celular sendo considerado, portanto, um material atóxico. Um estudo *in vivo*, aprovado pelo Comitê de Ética da PUCPR (Parecer n.07/05/CEPA), realizado com implantação do biomaterial em coelhos, constatou a sua biocompatibilidade (CAVALHEIRO, 2005). Com base nesses resultados pode-se considerar que a Anortita é um material candidato para enxerto ósseo, o que inspirou a realização deste trabalho.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é verificar a capacidade osteogênica do vitrocerâmico de Anortita através do cultivo *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas.

1.1.2 Objetivos específicos

Com a utilização das células tronco mesenquimais:

- a) Avaliar sua capacidade de adesão *in vitro* sobre a Anortita;
- b) Avaliar a capacidade osteoindutora da Anortita.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica abrange a definição de enxertos ósseos e dos diferentes tipos de enxertos que podem ser utilizados nas mais variadas alterações ósseas, com ênfase em cerâmicos, vidros e vitrocerâmicos. Para o entendimento da metodologia utilizada são abordados, em seguida, os conceitos sobre osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas (CTMs).

2.1 ENXERTOS ÓSSEOS

O enxerto ósseo pode ser realizado a partir de um pedaço de tecido ósseo ou de um material sintético fixado em regiões onde ocorreu fratura ou onde existem lesões ósseas, como ilustra a figura 1, para servir como ponte entre os tecidos naturais, acelerando a regeneração.

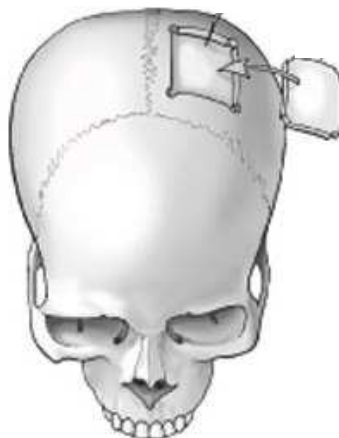


Figura 1. Esquema de enxerto sendo inserido em um grande defeito ósseo.
Fonte: (GALLER, SONNTAG, 2003)

O tecido ósseo tem como principais funções fornecer sustentação ao corpo, proteger órgãos internos e ser um reservatório de cálcio e fósforo. Pacientes que apresentam danos no tecido ósseo, sejam eles causados por doenças ósseas de diferentes origens ou por acidentes, apresentam uma perda em sua qualidade de vida. Quando os danos causados pelas diferentes origens acima citadas, são pequenos, o tecido ósseo apresenta uma maior capacidade de reconstituição (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008). Porém, danos extensos ocasionados por condições

patológicas como o câncer, por trauma ou degenerados pela idade, exigem a inserção de enxertos ósseos adequados para que a reconstituição óssea seja ideal, pois, apesar da capacidade regenerativa do osso, grandes lesões determinam perda do padrão de regeneração (KHONG, 2007);(STEVENS, 2005).

Os enxertos ósseos desempenham um papel de extrema importância na cirurgia ortopédica, os quais, considerando a origem, são classificados como autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos (SMITH *et al.*, 2009);(EAGAN; McALLISTER, 2009).

Enxerto autógeno é definido como um substituto ósseo obtido de um local saudável do mesmo sujeito, ou da mesma espécie. Neste caso, o material ósseo que será utilizado como enxerto é geralmente extraído da crista ilíaca, como ilustra a figura 2 (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008).

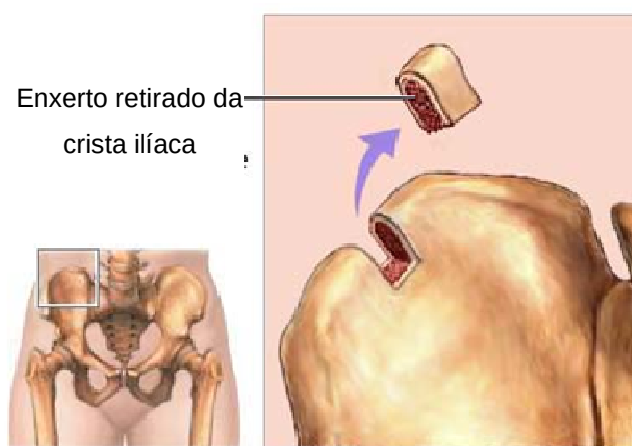


Figura 2. Retirada de um enxerto autógeno da crista ilíaca.
Fonte: (MEDLINE PLUS, 2009).

O enxerto ósseo retirado da crista ilíaca fornece uma estrutura osteocondutiva, células osteogênicas (osteoblastos) e proteínas osteoindutivas que aumentam a mitose assim como a diferenciação de células indiferenciadas em células osteogênicas típicas (GOMAR *et al.*, 2007). Segundo Bostrom e Seigerman, 2005, outra observação importante é que este tipo de enxerto diminui o risco de transmissão de doenças infecciosas e não induz resposta imune depois da implantação, reforçando sua habilidade de incorporação ao novo local (BOSTROM; SEIGERMAN, 2005).

No entanto, neste tipo de enxerto existe uma restrição importante em relação à quantidade de tecido ósseo que pode ser retirado do próprio paciente, impossibilitando o preenchimento completo do local afetado. Além disso, o aumento no tempo do procedimento cirúrgico e uma considerável perda de sangue pelo paciente tem sido observados, o que pode levar a um aumento do risco de morte. Algumas complicações pós cirúrgicas relacionadas à extração de enxerto da crista ilíaca tem sido relatadas como danos em nervos e em artérias, infecção, deformidades cosméticas, alteração da marcha, fraturas, hérnia e danos na junção sacro-ilíaca (HUBER *et al.*, 2006);(CARSON; BOSTROM, 2007).

A alternativa convencional ao enxerto autógeno é o alógeno obtido, tanto de cadáveres, quanto de doadores submetidos à artroplastia total de cintura pélvica (CARSON; BOSTROM, 2007).

Enxertos alógenos, provenientes de cadáveres, resolvem o problema da quantidade limitada característica dos autógenos. No entanto, apesar de todo o tratamento rigoroso realizado nos implantes alógenos para a sua descontaminação, existe o risco de transmissão de doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida, sífilis e hepatite e estes enxertos podem, ainda, induzir uma resposta imune do organismo hospedeiro (BOSTROM; SEIGERMAN, 2005).

Outra consideração importante a ser feita em relação aos enxertos alógenos é que as propriedades mecânicas, estruturais e de absorção de ossos humanos são alteradas pelas técnicas de preservação, processamento e de esterilização realizadas nos bancos de ossos e, portanto, a sua resposta no hospedeiro pode não ser a adequada (HUBER *et al.*, 2006). A figura 3 mostra uma peça de osso alógeno.



Figura 3. Enxerto alógeno proveniente de cadáver humano.
Fonte: (GADGET, 2009).

Os xenoenxertos são retirados de espécies animais e, por isso, necessitam de um tratamento antigênico para evitar transmissão de quaisquer materiais

estranhos ao organismo humano. Normalmente, antes da aplicação, o xenoenxerto é inserido juntamente com células da medula óssea humana (GUTIERRES, 2006).

Alguns fatores devem ser considerados para a seleção de uma espécie animal como um sistema modelo para a retirada de enxertos. O animal escolhido deve apresentar analogias fisiológicas e patofisiológicas com os seres humanos. Além disso, existem alguns critérios de seleção como custos de aquisição e cuidados, facilidade de encontrar o animal, aceitabilidade da sociedade e tolerância a cativeiros (REICHERT *et al.*, 2009).

Os xenoenxertos também podem provocar respostas imunes inadequadas que, somadas ao risco de transmissão de doenças, passam a ser consideradas complicações importantes na recuperação dos pacientes (PETERSEN; CARNWATH; NIEMANN, 2009).

Os enxertos ósseos sintéticos, aloplásticos, são alternativas interessantes para os demais tipos de enxertos, pois, se adequadamente esterilizados, são livres de infecções, não apresentam limitação na quantidade e a sua qualidade pode ser reproduzida (KAMITAKAHARA; OHTSUKI; MIYAZAKI, 2008). A figura 4 mostra um exemplo de material sintético utilizado como enxerto ósseo.



Figura 4. Enxerto sintético (aloplástico) confeccionado em material polimérico.
Fonte: (TORNIER, 2009)

Os enxertos ósseos sintéticos são usados devido as suas propriedades biológicas e estruturais (LICKORISH; GUAN; DAVIES, 2007);(PATEL; CATALANO, 2009). A sua utilização tem aumentado e tem-se mostrado como uma alternativa ao enxerto autólogo, pois diminui o tempo de cirurgia e não induz a morbidade no local de retirada do doador (PATEL; CATALANO, 2009).

A seleção de um biomaterial sintético é um passo importante no desenvolvimento de uma matriz extracelular para aplicação em engenharia de tecidos. O biomaterial ideal deve ser atóxico, biocompatível e deve promover

interações celulares para o crescimento de tecidos mantendo as propriedades físicas e mecânicas adequadas. Além disso, o enxerto deve ser degradável e absorvível, desaparecendo do organismo após exercer a sua função (MANO *et al.*, 2007).

Quando se utiliza uma MEC sintética com células progenitoras cultivadas, espera-se que estas secretem componentes específicos que induzam a sua proliferação e diferenciação em osteoblastos e resulte, dessa forma, na formação de um novo tecido (MANO *et al.*, 2007). Células diferenciadas em osteoblastos também podem ser cultivadas sobre as MECs a fim de favorecer a cicatrização óssea quando implantadas (KHANG *et al.*, 2006).

Dentre os materiais sintéticos utilizados como enxertos ósseos existem os cerâmicos, os vidros e os vitrocerâmicos que apresentam maior facilidade de fabricação em relação aos materiais poliméricos. Além de ser possível a produção de materiais cerâmicos sintéticos com uma composição parecida com a da matriz óssea inorgânica, não existe limitação na quantidade disponível, pois a matéria prima é abundante (GUTIERRES *et al.*, 2006).

Os biocerâmicos formados por hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, principal fonte de fosfato de cálcio do osso natural, ou β tricálcio fosfato, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, são porosos e, portanto, permitem o crescimento do tecido ósseo no seu interior. Apesar de serem osteocondutores, a hidroxiapatita é vagarosamente absorvida e o β tricálcio fosfato é absorvido com rapidez e, portanto, não são adequados para utilização como enxerto em locais onde sejam necessárias grandes quantidades de material, como ocorre quando existe uma lesão óssea extensa (SHIKINAMI *et al.*, 2006);(XU; WEIR; SIMON Jr., 2008);(BLOM, 2007).

Os biovidros são formados numa variedade de composições e tem a propriedade de se ligarem ao tecido ósseo, além de outros tecidos. São produzidos por fusão de um vidro convencional apresentando os seguintes componentes básicos: óxido de silício (SiO_2), óxido de sódio (Na_2O), óxido de cálcio (CaO) e óxido de fósforo (P_2O_5) (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007).

A principal característica dos biovidros é a capacidade de promover uma rápida e durável ligação química com o tecido ósseo, através de uma interface de apatita (fosfato de cálcio). A capacidade de um biovidro se ligar ao tecido ósseo, sofrer degradação e formar uma camada de apatita superficial varia em função da

composição e da relação molar ou mássica entre os constituintes (GUTIERRES *et al.*, 2006).

Os vidros bioativos são reabsorvíveis e osteoindutores e exercem controle sobre o ciclo celular do osteoblasto fazendo com que esta célula expresse genes que regulam a osteogênese e produza fatores de crescimento. É a partir desse vidro bioativo que se forma o vitrocerâmico em um processo chamado cristalização, o qual aumenta a resistência mecânica do material em comparação com o vidro, sem perder as características importantes do vidro bioativo (OLMO *et al.*, 2008).

Além da osteoindução, os vitrocerâmicos bioativos são transportadores de proteínas ósseas morfogenéticas, BMPs, que induzem a transformação das células precursoras hospedeiras em células produtoras de matriz óssea (BROVARONE *et al.*, 2007).

O sucesso dos enxertos ósseos, portanto, está diretamente relacionado com a sua capacidade de osteointegração. No processo *in vivo*, a superfície do biomaterial adsorve os fatores osteogênicos provenientes do sangue o que facilita a diferenciação osteoblástica a partir das células tronco, sintetizando e remodelando o tecido ósseo na região do implante. Portanto, a capacidade de adsorção de fatores osteogênicos e a velocidade de proliferação celular, são essenciais para que ocorra a osteointegração (SAWYER; HENNESSY; BELLIS, 2005).

2.2 OSTEOLASTOS

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo composto por uma matriz orgânica fortalecida por depósitos de cristais de fosfato de cálcio. A matriz orgânica é composta por fibras de colágeno tipo I (95% da matriz), proteoglicanos e numerosas proteínas não colágenas (5% da matriz). Na matriz orgânica estão inseridas as células ósseas como as osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, que participam da manutenção e organização do tecido ósseo (BARRÉRE; BLITTERSWIJK; GROOT, 2006).

Os osteoblastos são diferenciados a partir das células-tronco mesenquimais e estão localizados enfileirados ao redor de uma matriz óssea recém sintetizada, o osteóide, e do outro lado fazem contato com as células da medula óssea, células tronco hematopoiéticas e mesenquimais. Além da propriedade de depositar fibras

colágenas, os osteoblastos estão envolvidos na regulação das propriedades das células-tronco dentro do nicho das células-tronco hematopoéticas (ILMER *et al.*, 2009).

Existem genes e proteínas que participam do processo de indução da diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos. Com relação às proteínas, a família das proteínas ósseas (BMP), presentes em moléculas sinalizadoras, foi identificada e apresentou propriedades osteoindutivas, ou seja, promove a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, levando a formação do tecido ósseo. Uma das proteínas da família BMP, a BMP-2, participa da formação do tecido ósseo e do tecido cartilaginoso. No processo de ossificação endocondral, ou seja, na formação de tecido ósseo a partir de uma peça de cartilagem hialina, a BMP2 aparece expressa em condrócitos hipertróficos e também no pericôndrio osteogênico. Esta proteína também estimula as cascatas de sinalização que são imprescindíveis para a transformação das células osteoprogenitoras em osteoblastos (CHANDLER *et al.*, 2007).

Com relação aos genes que participam da indução da diferenciação em osteoblastos, o *RUNX2* e a *BETA-CATENINA* são bem conhecidos. O gene *RUNX2* codifica proteínas importantes, que são fatores de transcrição, para a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos. *RUNX2* é expresso nas células do pericôndrio de ossos endocondrais e nas camadas que envolvem o osso intramembranoso (CHANDLER *et al.*, 2007).

A Beta-catenina é importante nas fases iniciais da cicatrização da fratura já que induz a diferenciação de células mesenquimais em linhagens osteoblásticas e condroblásticas. A célula mesenquimal não expressa Beta-catenina. A expressão deste gene começa a ser evidenciada pela presença de proteína específica ou quando se forma uma célula com os primeiros traços fenotípicos de condrócito ou osteoblasto, sugerindo uma participação importante do gene nas fases iniciais da diferenciação daquelas linhagens celulares (CHEN *et al.*, 2007).

Existem muitas fontes de células mesenquimais para o reparo ósseo. As células melhores caracterizadas são as derivadas da medula óssea que produzem uma população de células-tronco mesenquimais das quais pode se derivar células de diferentes tecidos. Células-tronco mesenquimais multipotentes derivadas da medula óssea são capazes de renovação própria por muitas gerações sem perda significativa de suas características (MARCACCI *et al.*, 2007).

O cultivo de células mesenquimais com Dexametasona, Ácido Ascórbico e Beta-Glicerofosfato favorece a diferenciação em osteoblastos, confirmada pela análise da morfologia, atividade de fosfatase alcalina, expressão de osteocalcina e mineralização da matriz extracelular (ARINZEH, 2005).

2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

As células tronco mesenquimais, CTMs, foram primeiramente identificadas pelo pesquisador russo A.J. Friedenstein, em 1960 e, desde então, vem sendo estudadas para aplicações em terapia celular devido a sua propriedade de diferenciação em diversos tipos celulares (MUSINA; YEGOROV; BELYAVSKY, 2004);(OLMO *et al.*, 2008).

Estas células demonstraram propriedades quimiotáticas e de migração para locais de inflamação e reparação. Além disso, podem secretar mediadores parácrinos capazes de reverter reações inflamatórias agudas nos mais variados órgãos do corpo humano. Devido às suas características, as CTMs, são uma ferramenta promissora a ser utilizada em pesquisas relacionadas à terapia celular regenerativa e imunoregulatória (BERNARDO; LOCATELLI; FIBBE, 2009), as quais tem apresentado avanços importantes na ciência atual.

Recentemente, uma nomenclatura padronizada para CTMs foi proposta e o termo células estromais mesenquimais multipotentes foi introduzido para referir a essa população de células aderentes no material plástico e com forma parecida com o fibroblasto (BERNARDO; LOCATELLI; FIBBE, 2009).

Uma das características principais das CTMs é ser multipotente, ou seja, ter a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens mesenquimais, tais como: células do tecido ósseo, cartilaginoso, muscular, adiposo e tendão. Estudos tem demonstrado, ainda, que as células-tronco mesenquimais são capazes de modular, *in vitro*, a função de diversas células que participam da resposta imune. Ainda não está claro se a modulação da função das células é uma real supressão da resposta imune ou um efeito antiproliferativo não específico. Os efeitos imunossupressivos estão restritos a estudos *in vitro* (BERNARDO; LOCATELLI; FIBBE, 2009).

No cultivo *in vitro* as CTMs apresentam uma heterogeneidade da população em relação à taxa de proliferação e à morfologia, cuja caracterização é dificultada

pela ausência de marcadores antigênicos específicos. Diversos estudos sugerem ainda uma reversibilidade do processo de diferenciação, ocorrendo uma alternância entre as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

Apesar das células-tronco embrionárias serem atrativas devido a sua pluripotencialidade, isto é, a sua capacidade de se diferenciar em qualquer linhagem celular, a sua diferenciação em um tipo específico celular ainda não é totalmente dominada, podendo ocorrer diferenciação espontânea em múltiplos tipos celulares, formando tumores conhecidos como teratomas. Isto faz com que as CTMs, células adultas que podem ser isoladas de diversas fontes e expandidas *in vitro*, sejam mais utilizadas do que as embrionárias (DAWSON *et al.*, 2008);(DROSSE *et al.*, 2008);(XU; WEIR; SIMON Jr., 2008).

O número de células tronco disponível no organismo diminui com a idade do indivíduo. Isto se deve à necessidade de formação de novos tecidos e de crescimento durante as primeiras fases da vida. Da mesma forma, o estado de saúde do indivíduo altera a quantidade de células-tronco, o que influencia na capacidade regenerativa dos tecidos. No entanto, é possível, *in vitro*, enriquecer o meio através da expansão das células-tronco e, conseqüentemente, aumentar a capacidade regenerativa (LANZA, 2004).

Não existe consenso, até o momento, de que a idade ou o estado de saúde interfiram na funcionalidade das células-tronco. Tem-se observado que alguns medicamentos tornam difícil a expansão *in vitro* das células, no entanto, parece não influenciarem na funcionalidade das mesmas (LANZA, 2004).

As CTMs humanas podem ser combinadas com uma MEC para enxerto a fim de direcioná-las para uma diferenciação específica, como por exemplo, para diminuir o tempo de cicatrização em caso de problemas na formação do tecido ósseo (XU; WEIR; SIMON Jr., 2008).

Para que a integração entre o enxerto e o tecido ósseo seja satisfatória, as células precursoras de osteoblasto precisam se ligar à superfície do implante, se diferenciar e, assim, ocorrer a formação de uma nova matriz óssea no local da lesão. Uma estratégia comum para melhorar a integração do implante é cobrir a sua superfície com peptídeos que imitam a matriz extracelular do hospedeiro com o propósito de fornecer locais de adesão para receptores de células osteogênicas. Um dos peptídeos promotores de adesão mais estudados é o Arg-Gly-Asp, (RGD), uma

sequência de três aminoácidos encontrada no interior de algumas proteínas da matriz óssea tais como a fibronectina, (FN), e a vitronectina, (VN) (HENNESSY *et al.*, 2009).

Depois do isolamento as CTMs, estas são colocadas em meios de cultura com suplementos que favorecem a diferenciação em osteoblastos como, por exemplo, a dexametasona, o ácido ascórbico e as proteínas morfogenéticas (DROSSE *et al.*, 2008; BERNARDO, LOCATELLI, FIBBE, 2009; GOMAR *et al.*, 2007).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE OSTEOLÁSTICA *IN VITRO*

Durante a diferenciação de células tronco em osteoblastos *in vitro* são utilizados marcadores bioquímicos para identificar: acúmulo de matriz colágena, expressão da enzima fosfatase alcalina, FAO, expressão de osteocalcina e mineralização de nódulos de fosfatos (HSU *et al.*, 2007).

Marcadores bioquímicos de remodelação óssea são enzimas expressas por osteoblastos e osteoclastos ou podem ainda ser compostos liberados durante o processo dinâmico de formação e destruição do tecido ósseo (CARDOSO, 2007). O marcador mais utilizado é a FAO, uma enzima produzida apenas pelos osteoblastos, essencial para a mineralização óssea e, portanto, quando produzida em altos níveis indica, na cultura de células, a ocorrência de diferenciação osteoblástica (OREFFO; TRIFFITT, 1999);(CARDOSO, 2007).

O processo de detecção da atividade da FAO consiste na transferência do grupo fosfato do P-Nitrofenilfosfato para a Dietanolamina liberando o P-nitrofenol. Assim, a concentração da enzima é determinada pela velocidade de formação do P-nitrofenol, determinada a 405 nm (BALLONI *et al.*, 2009).

A atividade da FAO é registrada em unidades por litro (U/l) e os valores de referência são: até 13 anos onde existe alta atividade osteoblástica, de 56 a 156 U/l e após os 14 anos de 13 a 46 U/l (HENRY, 2008).

O aumento significativo fornecido pelas imagens conseguidas pela Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, permite uma observação detalhada da morfologia das células mesenquimais e dos osteoblastos. Além disso, é possível visualizar a matriz extracelular, que constitui papel fundamental no desenvolvimento

dos osteoblastos. Com o MEV são observados claramente os depósitos de minerais muito comuns em cultivos de osteoblastos (SANTIAGO *et al.*, 2005);(KHANG *et al.*, 2006). O MEV, portanto, fornece a constatação visual dos resultados obtidos com a FAO.

A confirmação dos depósitos de cálcio, no entanto, deve ser realizada através de difração de raios-X, ou por meio de revelação destes depósitos com o corante Vermelho de Alizarina S o qual cora, especificamente, nódulos ou arranjos difusos compostos por sais de cálcio, Ca, e de fósforo, P (CIAPETTI, 2006).

Este composto forma um quelato com o cálcio colorindo os cristais. Os cristais de oxalato de cálcio são tingidos em laranja avermelhado, com o vermelho de Alizarina S, apenas quando a solução se encontra em pH 7,0. Os cristais de fosfato de cálcio e os de carbonato de cálcio, no entanto, são evidenciados com o mesmo corante em pH 7,0 e em pH 4,2. Esta diferença permite a distinção entre um cristal e outro (PROIA; BRINN, 1985).

3 METODOLOGIA

A fim de tornar a metodologia clara, esta foi dividida em quatro etapas: a fabricação das peças em vitrocerâmico; o processo de isolamento e expansão das CTMs; o procedimento de cultivo das células e, finalmente, a caracterização da capacidade osteocondutora e osteoindutora do vitrocerâmico.

3.1 FABRICAÇÃO DAS PEÇAS EM VITROCERÂMICO ANORTITA

As peças de vitrocerâmico Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) foram fabricadas seguindo o procedimento de fusão e de cristalização, típicos para a confecção destes materiais, no Instituto Grade de Ciências Básicas, IGCB.

A mistura dos pós-componentes da Anortita - alumina (Al_2O_3), sílica (SiO_2) e calcário (CaCO_3) - foi realizada através de um moinho de bolas em meio úmido durante 3 h. Em seguida a mistura de pós foi deixada em descanso durante 3 h para eliminar o excesso de umidade.

A mistura de pós foi, então, transferida para cadinhos de alumina de 100 ml (aproximadamente 100 g por cadinho), pesada em Balança Marte modelo AS2000C ($\pm 0,01$ g), como ilustra a figura 5.



Figura 5. Mistura de pós em cadinho de alumina sobre balança (IGCB).

O cadinho contendo a mistura de pós à temperatura ambiente foi levado ao forno Yung modelo 0616, o qual foi aquecido e mantido por 3 horas na temperatura de 1580°C para fusão completa do pó.

O cadinho contendo o material fundido foi rapidamente retirado do forno e vertido sobre a matriz em aço inoxidável 304, mantida aquecida para facilitar a conformação da pastilha. Depois de vertido, o material foi prensado manualmente e, durante este processo, solidificou formando a peça vítrea. A retirada do material fundido, o vazamento na matriz aquecida e a prensagem são mostrados na figura 6.

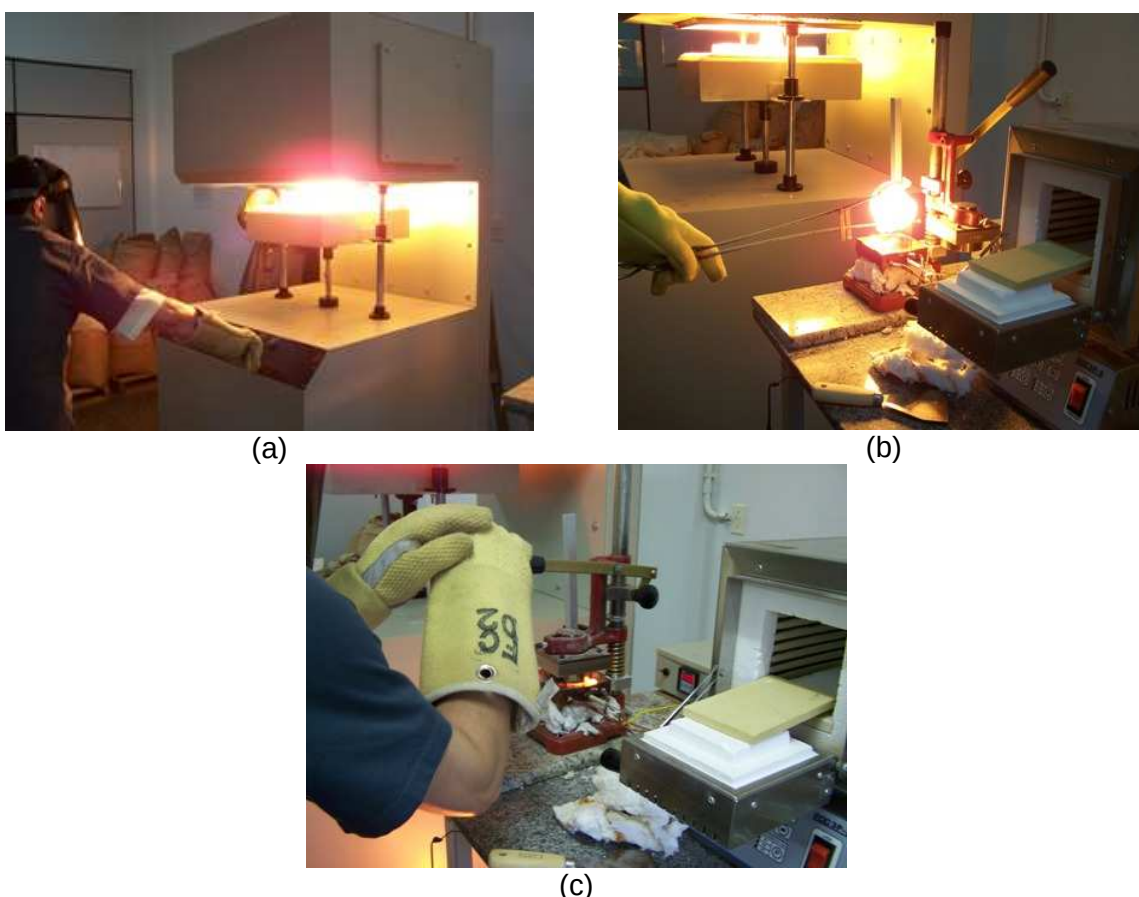


Figura 6. Processo de fabricação das amostras, usando um forno de 1600°C : (a) abertura do forno para a retirada do material fundido, (b) vazamento do material fundido sobre a matriz aquecida e (c) prensagem manual do material fundido para a conformação da pastilha vítrea.

A figura 7 mostra a pastilha conformada pronta para o processo de cristalização que fornece o material vitrocerâmico. A pastilha sofreu fratura devido ao choque térmico, pois o ambiente externo ao forno era condicionado em 20°C .



Figura 7. Pastilha de Anortita na fase vítrea 1:1.

Para tornar a peça mecanicamente mais resistente e mais biocompatível (índice de cristalização entre 70% e 80%), a pastilha sofreu tratamento térmico em temperaturas e tempos definidos experimentalmente (MU8702882-1). O tratamento térmico foi realizado em forno de cristalização EDG modelo Inoxline 1800-EPS.

O tratamento térmico definiu o índice de cristalização da peça. A figura 8 mostra um pedaço da peça que sofreu tratamento térmico, utilizada na cultura das CTMs.



Figura 8. Parte da pastilha cristalizada 1:1.

3.2 ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CTMs

As CTMs foram obtidas da medula óssea cuja coleta foi realizada por meio da punção da crista ilíaca de 3 voluntários portadores de cardiopatia dilatada, os quais participaram do estudo após aprovação pelo Comitê de Ética da PUC-PR (Parecer n. 0002571/09), Anexo A.

A coleta foi realizada após assinatura, pelo voluntário, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Anexo B, no qual constava que faziam parte de outro projeto de pesquisa em andamento intitulado “Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias - Cardiopatia Dilatada” e que

concordavam com a retirada de um volume extra de 5 ml para o atual experimento. Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUC-PR, onde foi feito o isolamento das células mononucleares, entre as quais estavam as CTMs.

O estudo foi realizado em triplicata biológica, ou seja, todo o procedimento descrito no cultivo das células e nas análises da osteogênese foi realizado para as células isoladas de 3 voluntários. Este procedimento tem a intenção de confirmar o resultado do experimento, já que os resultados encontrados, assim como os comportamentos de crescimento e desenvolvimento da cultura das CTMs devem ser similares nos três casos, a fim de se possa afirmar que os mesmos não sejam afetado por erros nos procedimentos.

Como o objetivo do trabalho foi identificar a característica osteoindutora da Anortita, não houve necessidade de estabelecer critérios de inclusão e exclusão para os voluntários, pois, independente do sexo, idade ou estado de saúde, as células tronco depois de isoladas, expandidas e cultivadas, são capazes de sofrer diferenciação (LANZA, 2004). O único critério estabelecido para o cultivo sobre o biomaterial foi a confluência em 80%, momento em que as células estão bem próximas umas das outras.

O volume de 5 ml de medula óssea coletado foi colocado em um tubo cônico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Switzerland) juntamente com 15 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium – Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Para a separação das células mononucleares, foi utilizado o Ficoll-Hypaque com massa específica 1,077 g/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA).

O volume de 10 ml do Ficoll foi colocado em um tubo cônico de 50 mL e sobre ele foi adicionada a mistura de medula óssea e meio de cultura, como mostra a figura 9. Em seguida, esse tubo foi centrifugado a 1800 rpm durante 30 minutos.



Figura 9. Medula óssea diluída em meio de cultura sobre a solução de Ficoll-Hypaque.

Após a centrifugação foi possível observar quatro frações como mostra a figura 10: a superior contendo o plasma e o meio de cultura, a interface contendo as células mononucleares, em seguida o Ficoll, e a inferior contendo os eritrócitos e granulócitos que formaram um sedimento celular no fundo do tubo.

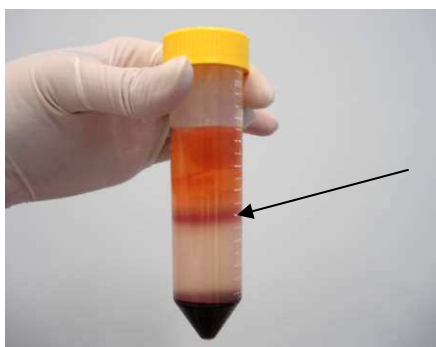


Figura 10. Anel de células mononucleares (seta) após a centrifugação com Ficoll-Hypaque

O anel de células mononucleares foi aspirado e transferido para um novo tubo cônico onde foram adicionados 12 ml de meio DMEM para lavagem do *pellet* celular. Este tubo foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. O processo de lavagem foi realizado mais uma vez.

Após a última centrifugação foi retirado o sobrenadante e acrescentados 5 ml de meio DMEM com 15% de Soro fetal bovino (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), 1% de antibiótico penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). As células foram homogeneizadas e contadas em Câmara de Neubauer antes de serem plaqueadas em garrafas de cultura de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) em uma concentração final de 1×10^6 células/ml e volume final de 10 ml. Estas garrafas foram colocadas em estufa (Thermo Forma) com temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

A manutenção da qualidade celular depende da troca periódica do meio de cultura, portanto, após 48 horas do plaqueamento, foi realizada a primeira troca do meio. As demais trocas foram feitas 2 a 3 vezes por semana, sendo que a cada troca de meio as células não aderentes, misturadas ao sobrenadante, foram retiradas da garrafa com uma pipeta estéril de 10 ml (TPP, Trasadingen, Switzerland). As aderentes, compostas pelas CTMs, permaneciam no frasco. O meio de cultura de troca utilizado foi o DMEM acrescido de 15% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico.

Diariamente, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido (Olympus CK40), mostrado na figura 11, a fim de se verificar a confluência das mesmas. Quando foi observada a confluência de 80-90%, mostrada na figura 12, foi realizada a tripsinização que é a dissociação das células aderidas do fundo da garrafa.



Figura 11. Microscópio Óptico Invertido usado para a verificação da confluência das células.

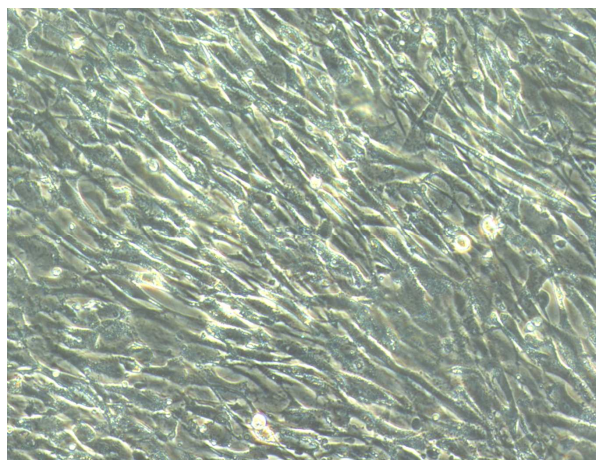


Figura 12. Confluência de 80% das CTMs observadas em microscópio óptico invertido.

Para a liberação das células aderidas da superfície interna da garrafa foi utilizada uma solução contendo Trypsin-EDTA 05%, 1x, (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Para a liberação das células da superfície, onde estavam aderidas, o meio foi descartado e, em seguida, a monocamada foi submetida a 2 lavagens com 5 ml de PBS para a remoção do soro presente no meio de cultura, o qual impede a ação da tripsina. Em seguida, foram adicionados 4 ml da solução de tripsina-EDTA em cada garrafa.

Os frascos foram incubados por 4 min., em estufa de CO₂ 5% a 37°C, tempo necessário para que a tripsina-EDTA pudesse agir sobre a monocamada, liberando as células que, anteriormente estavam aderidas à superfície plástica, para o sobrenadante. Em seguida, as garrafas foram levemente agitadas para facilitar o descolamento das células aderidas, o que foi confirmado através do microscópio óptico invertido. Foram, então, adicionados, em cada garrafa, 1 ml de SFB e 4 ml de meio DMEM para inibir a atividade da tripsina. Todo o conteúdo das garrafas foi transferido para um único tubo cônico para a centrifugação durante 10 min. a 1500 rpm para a sedimentação do *pellet* de células e retirada da tripsina que se encontrava no sobrenadante.

Foi acrescentado meio DMEM com 15% de SFB para homogeneização das células, contagem em câmara de Neubauer e, em seguida, foi realizado o plaqueamento em novas garrafas de 75 cm². Após a quarta tripsinização, as células foram ressuspensas em meio DMEM contendo 15% de SFB e foi realizada a distribuição das células nas placas de cultura de 24 poços, onde ocorreu o monitoramento com troca de meio até que uma confluência de 80% fosse atingida. Todos os experimentos foram realizados na 4ª passagem.

As CTMs isoladas e cultivadas por esta metodologia foram previamente caracterizadas quanto à sua morfologia, potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos e quanto aos marcadores de superfície (REBELATTO *et al.*, 2008).

3.3 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

O procedimento para as células isoladas e expandidas de cada um dos três voluntários foi idêntico. O cultivo foi realizado em placas de cultivo de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) dos quais 16 foram usados.

Inicialmente, foram distribuídas 20.000 células por poço diluídas em meio DMEM suplementado com 15% de SFB, em 4 placas de cultura (I, II, III e IV), de acordo com a configuração mostrada na figura 13, na qual é mostrada as duplicatas técnicas. Os poços que não tinham biomaterial, BIO, apresentavam no seu interior lamínulas de vidro. Quatro placas foram usadas a fim de que fosse possível realizar

as análises no primeiro dia de cultivo (controle) e no 7^o, 14^o e 21^o dias. A esterilização das peças do biomaterial foi realizada com óxido de etileno, EtO.

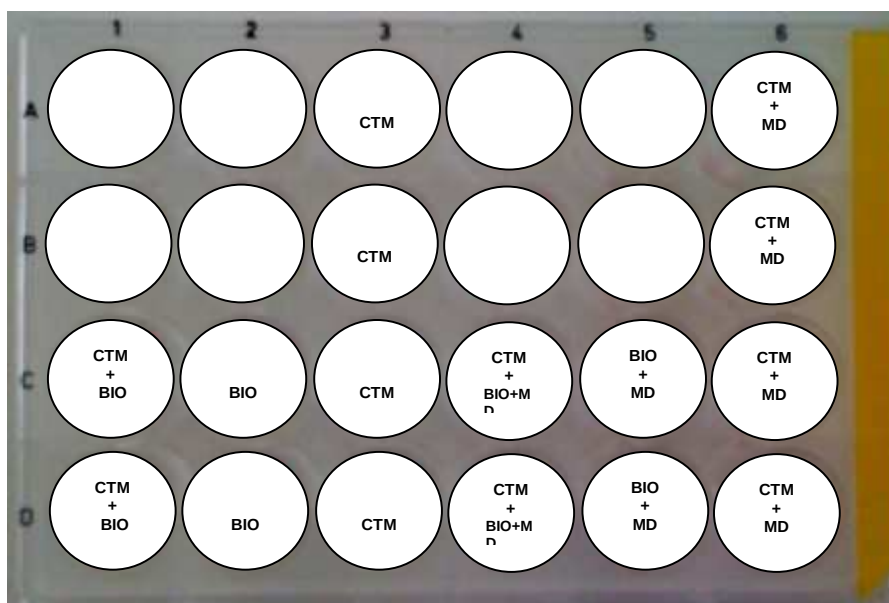


Figura 13. Esquema das placas I, II, III, e IV de cada voluntário. BIO = Biomaterial, CTM = Células Tronco Mesenquimais, MD = Meio de diferenciação.

O sobrenadante dos cultivos da placa I, de cada voluntário, foi usado para a dosagem da FAO no 1^o dia. O conteúdo da placas II, III e IV foi usado para MEV, FAO e Citoquímica no 7^o, 14^o e 21^o dias. Assim, os poços das filas A e B foram utilizados para análise por citoquímica para avaliar o potencial de diferenciação das CTMs cultivadas com o meio de diferenciação, MD, para transformação em osteoblastos. O sobrenadante dos poços das filas C e D foram utilizados para análise da atividade da FAO e as células e BIO para o MEV para avaliar a morfologia celular, a capacidade osteoindutora do BIO e avaliar se o MD teria alguma influência no processo de indução osteoblástica.

Para a observação em MEV, foram utilizados os materiais das placas do primeiro paciente apenas, pois, como esta análise foi realizada com a intenção de verificar o comportamento das CTMs quando em contato com a Anortita, não foi necessária a comparação com os demais voluntários.

O MD usado para induzir a diferenciação das CTMs em osteoblastos era constituído por meio DMEM suplementado com 15% de SFB, 0,1 µmol/l de dexametasona (Sigma Chemical, St Louis, USA), 10 mmol/l de β-glicerolfosfato

(Sigma Chemical, St Louis, USA) e 50 $\mu\text{mol/l}$ de ascorbato (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Este meio foi adicionado após confluência de 80% das células, aproximadamente 48 horas após o início do cultivo. O 1º dia da diferenciação é o dia que foi adicionado o MD, ou seja, aproximadamente três dias após o início do cultivo.

O meio de cultura comum a todos os poços foi DMEM mais 15% de SFB e 1% de antibiótico.

Após a adição dos respectivos meios em cada poço, a manutenção das culturas foi realizada com a troca de meio três vezes por semana.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOGÊNESE

3.4.1 Atividade da Fosfatase Alcalina (FAO)

A FAO foi determinada através de sistema cinético (Invitro-human, Itabira, Brasil) onde, em meio alcalino, a FAO transfere o grupo fosfato do p-Nitrofenilfosfato para a Dietanolamina liberando o p-Nitrofenol. A concentração da enzima é determinada pela velocidade de formação do p-Nitrofenol, medida em 405 nm.

Os sobrenadantes das culturas nas diferentes condições foram coletados em microtubos (Axygen, USA) e armazenados em freezer a -20°C (Electrolux, FE 26) até o momento da dosagem, quando as amostras foram deixadas fora do freezer até que atingiram a temperatura ambiente.

Foram adicionados 20 μl da amostra à mistura de substrato e solução tampão (kit comercial) na proporção de 4 partes de tampão para 1 parte de substrato. A mistura foi homogeneizada com agitação manual e transferida para uma cubeta a 37°C , lida em 405 nm.

Depois de 1 min. foi realizada a leitura da absorbância, disparando simultaneamente o cronômetro. As leituras foram repetidas em intervalos de 1, 2 e 3 min. para o cálculo da média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a retirada do meio de cultura, as lamínulas e os biomateriais foram transferidos para outra placa de 24 poços, respeitando as posições da placa anterior. Nesta nova placa foram adicionados os reagentes necessários para este procedimento, garantindo a imersão da lamínula e do biomaterial.

Foram realizadas três lavagens com tampão Cacodilato de Sódio a 0,1 M, adicionado o fixador Glutaraldeído a 2,5 %, e os materiais foram deixados em repouso por 1 h e 30 min. Após a retirada do fixador, o material foi submetido a 4 lavagens com tampão Cacodilato 0,1M e, em seguida, os materiais foram desidratados em soluções de graduação crescente de etanol através de imersões de 20 min., da seguinte forma: dois banhos de etanol 50% seguidos de mais dois banhos de etanol 70%. Após o último banho, foi acrescentado na placa com os materiais, uma solução de etanol 70% para a conservação em refrigerador a -4°C. Antes do ponto crítico e da metalização para visualização no MEV, foram realizadas mais duas lavagens com etanol 100%.

Depois que o material foi fixado e desidratado em soluções crescentes de etanol, levou-se para o ponto crítico que consiste na remoção do restante de água remanescente no material. O material foi colocado em um suporte, posicionado dentro do ponto crítico (Bal Tec CPD-030) contendo álcool 70%. A refrigeração foi acionada e, quando a temperatura atingiu 5°C a agitação foi ligada e permitiu-se a entrada de CO₂ líquido. Este procedimento permite que todo o álcool contido na amostra seja substituído por CO₂, ponto onde é possível observar a formação de neve carbônica na mangueira. O cilindro de CO₂ foi então fechado e deu-se início ao aquecimento até a temperatura de 42°C, em pressão de 68 bar, quando o CO₂ passa do estado líquido para o gasoso (ponto crítico do CO₂), permitindo que a amostra fique totalmente seca. Neste momento a amostra ficou pronta para a próxima etapa que é a metalização.

Na metalização o material foi posicionado em um suporte de alumínio e inserido no equipamento de deposição do metalizador (Balzers SCD-030) para ser feita a colocação de uma fina camada de ouro sobre o material, permitindo que conduza eletricidade, tornando-o, desta forma, visível no MEV.

3.4.3 Citoquímica

Para a citoquímica, o meio de cultura foi descartado e, em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS. O material foi, então, fixado com 1ml de solução de Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brasil) por 10 min. Os poços foram então lavados duas vezes com álcool 70% e duas vezes com água mili-Q.

O corante foi previamente preparado de modo a obterem-se duas soluções: uma de pH 4,2, que cora o carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio e outra de pH 7,0 que cora o oxalato de cálcio.

O corante Vermelho de Alizarina (Fluka Chemic, Buchs, UK) foi adicionado aos poços num volume suficiente para cobrir a lamínula, permanecendo nos poços durante 15 min. Após a coloração o material foi lavado em água mili-Q por duas vezes. Foi utilizado para contra coloração o light-green (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Seguindo o protocolo de microscopia óptica, as lamínulas passaram por uma bateria de reagentes: acetona 100% (2x), 2 acetona:1 xilol; 1 acetona:1 xilol, 1 acetona: 2 xilol e xilol 100% (2x). Após a última solução, a lamínula foi posicionada cuidadosamente de modo que a face com as células estivesse voltada para a lâmina contendo uma gota de Histolan (Biotec, Paraná, Brasil) depositada em sua superfície. As lâminas secaram durante 24 h para posterior análise em microscópio óptico (Olympus CX31, Alemanha).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA (FAO)

A FAO é considerada um marcador da presença de osteoblasto e a expressão da sua atividade foi monitorada a partir do sobrenadante dos poços especificados no quadro 1, coletados das placas I, II, III e IV, referentes ao 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dias, respectivamente.

Para a determinação da atividade enzimática da FAO foi usado o leitor de ELISA por meio do método cinético otimizado no comprimento de onda de 405 nm.

A análise dos resultados foi qualitativa, considerando que o objetivo foi qualificar o biomaterial como osteoindutor, comparando esta característica com um padrão. Como a osteoindução não pode ser quantificada, o número de amostras foi considerado suficiente para qualificar tanto o biomaterial quanto à sua osteoindução quanto as CTMs como viáveis. A tabela 1 mostra os valores das FAO para os três voluntários, para mais fácil comparação.

Tabela 1. Resultados da FAO (U/l) para os três voluntários nos dias 1, 7, 14 e 21, de acordo com o conteúdo das placas.

Dia	Voluntário	CTM	CTM + BIO	CTM + MD	CTM + BIO + MD
1	1	58,6	55,9	57,2	67,3
	2	13,5	10,8	14,2	11,1
	3	13,5	10,8	14,2	10,8
	Média	28,9	27,6	30,5	28,3
	Mínimo	13,5	10,8	14,2	10,8
	Máximo	59,9	61,3	63,3	63,3
7	1	58,6	55,9	57,2	67,3
	2	17,5	15,2	14,8	12,1
	3	31	46,5	33,9	31,7
	Média	35,7	39	35,2	36,8
	Mínimo	17,5	14,8	14,8	11,5
	Máximo	58,6	55,9	57,2	67,3
14	1	63,3	59,9	60,6	55,9
	2	21,6	13,1	12,1	11,4
	3	58,9	14,3	53,3	62,8
	Média	47,9	28,5	42	43,6
	Mínimo	21,6	11,5	12,1	12,1
	Máximo	63,3	59,9	60,6	62,8
21	1	38,4	26,3	59,9	51,2
	2	24,6	17,2	16,7	20,2
	3	38,1	30,1	60	32,5
	Média	33,7	25	45,5	33,8
	Mínimo	24,6	18,7	16,7	17,7
	Máximo	38,4	30,1	60	51,2

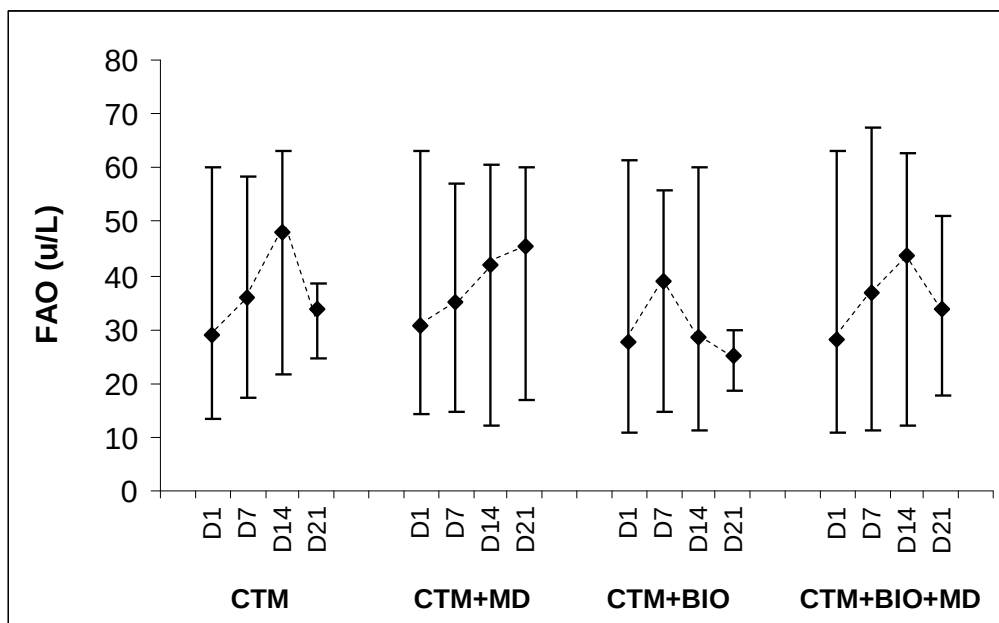


Figura 14. valores médios, mínimos e máximos dos três voluntários considerando-se cada amostra em cada dia de avaliação.

Apesar dos valores da FAO serem diferentes entre os voluntários, a análise qualitativa é válida, pois o que se busca é o aumento dos valores da FAO em relação ao estado inicial do mesmo voluntário, o que indicará o aumento da atividade osteoblástica. Por este motivo, os resultados são discutidos separadamente, para cada voluntário.

A produção da FAO pelas CTMs isoladas dos 3 voluntários mostraram comportamentos bastante semelhantes. Analisando os resultados por período de cultivo, no primeiro dia, o segundo e o terceiro voluntários apresentaram valores de FAO muito próximos, entre valores de mínimo e máximo idênticos de 10,8 U/l e 14,2 U/l, respectivamente.

Os altos valores encontrados no primeiro voluntário, entre 55,9 U/l e 67,3 U/l, podem ser resultantes de uma disfunção biliar, presença de lesões ósseas ou metástase tumoral (HENRY, 2008). Muitos pesquisadores sugerem, sem confirmação, que a idade, o sexo e doenças do doador podem influenciar na elasticidade e na capacidade de proliferação das células tronco, assim como a sua capacidade osteogênica (CIAPETTI *et al.*, 2006) (LANZA, 2004).

Os voluntários eram cardiopatas e, portanto, usuários de medicamentos destinados às funções cardiovasculares. Estudos mostram, no entanto, que apesar

de alguns medicamentos tornarem difícil a expansão *in vitro* das células, parece não influenciarem na funcionalidade das mesmas (LANZA, 2004). Portanto, os medicamentos ingeridos pelos voluntários provavelmente não são os responsáveis pela diferença nos resultados da FAO.

Analisando os resultados separadamente, as CTMs do primeiro voluntário tiveram uma diminuição da atividade da FAO entre os dias 1 e 7. O que mais chama a atenção é o fato do valor da FAO nos poços da placa do 7^o dia, que continham apenas CTM, continuarem próximos ao dos poços da placa do 1^o dia com o mesmo conteúdo, enquanto que os demais poços sofreram diminuição dos valores.

A FAO é um marcador inicial da diferenciação osteoblástica e a sua quantidade diminui à medida que a mineralização aumenta. Portanto, a atividade da FAO tende a aumentar entre o 1^o e o 14^o dia de cultura, diminuindo a partir de então, quando ocorre um aumento da osteocalcina, sugerindo que a cultura está progredindo para uma alta taxa de mineralização, ou seja, para a formação de células maduras constituintes do tecido ósseo (RATISOONTORN *et al.*, 2005). Este comportamento pode ser confirmado nos resultados do MEV apresentados na figura 15, discutidos posteriormente.

Embora a formação do tecido ósseo seja um processo complexo e não totalmente dominado, sabe-se que a proliferação celular e a diferenciação em osteoblastos são fenômenos quase excludentes, ou seja, o aumento da diferenciação celular causa uma diminuição nos valores de FAO (GALLI *et al.*, 2005; RATISOONTORN *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados no 21^o dia, ainda do primeiro voluntário, mostram a diminuição da FAO, indicando o aumento da diferenciação celular, o que pode ser verificado nas imagens registradas através do MEV, discutidas no tópico seguinte. Neste estágio, ocorre um aumento da osteocalcina que está relacionado com a mineralização do colágeno. Esta enzima, no entanto, não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Interessante notar que a diminuição da FAO foi notável nos poços que continham CTM e CTM + BIO, sem a presença do meio de diferenciação. Os poços que continham o MD continuaram com altos valores de FAO, o que sugere que o mesmo dificulta a diferenciação celular e atrasa o processo de mineralização do colágeno formado nos primeiros estágios do cultivo celular. Nota-se ainda que o biomaterial cultivado com as CTMs não necessitou de meio de diferenciação para

induzir a formação de osteoblastos, comprovado pelo valor de pico da FAO no 14^o dia de 59,9 U/l. Ainda, o biomaterial parece ter induzido a mineralização do colágeno, o que pode ser deduzido pela diminuição no valor da FAO, 26,3 U/l, no 21^o, inferior ao valor encontrado nas CTMs sozinhas de 38,4 U/l.

O segundo voluntário apresentou, no 1^o dia, nível de FAO considerado normal nas CTMs sozinhas, 13,5 U/l. No 7^o dia ocorreu um aumento da FAO em todos os poços, no entanto, de forma mais pronunciada naqueles que continham apenas CTMs, 17,5 U/l, e nos que continham CTM + BIO, 15,2 U/l, mostrando que o MD não interferiu no início da diferenciação osteoblástica, como era de se esperar, quando comparado com os poços sem MD. Os valores do 14^o dia mostraram pouca variação na FOA nos poços com presença de MD. No entanto, nos poços contendo apenas CTM, a FAO continuou a aumentar, 21,6 U/l, enquanto que, nos poços com CTM + BIO ocorreu uma diminuição, 13,1 U/l, indicando início de diferenciação celular. O esperado para o 21^o dia era que houvesse uma grande queda no valor da FAO. No entanto, os valores aumentaram em todos os poços, inclusive em relação aos valores do 1^o dia. Estes valores podem ter sido acarretados por erros de leitura ou de procedimento.

O terceiro voluntário também apresentou valores normais de FAO nas CTMs, máximo de 13,5 U/l, lidos no 1^o dia. No 7^o dia houve um aumento sensível dos valores da FAO em todos os poços sendo mais pronunciado no poço que continha CTM + BIO, máximo de 46,5 U/l. No 14^o dia, apenas o poço contendo CTM + BIO apresentou diminuição no valor da FAO, indicando o início da diferenciação celular. Os demais poços apresentaram aumento bastante pronunciado da FAO em relação ao 7^o dia, indicando formação de osteoblastos. No 21^o dia, o poço contendo CTM + BIO teve um aumento no valor da FAO, como esperado. O poço com CTM + BIO + MD manteve os valores elevados da FAO entre 1^o e 21^o dias, indicando baixa proliferação celular.

Os valores da FAO das CTMs do segundo e terceiro voluntários, apresentaram valores mais próximos dos normais na análise do 1^o dia e a presença do MD afetou a proliferação celular aumentando, portanto, o período de diferenciação. De acordo com Ratisoontorn *et al.*, 2005, este comportamento evidencia não haver progresso no sentido da mineralização, ou seja, da maturação dos osteoblastos.

Também para o segundo e terceiro voluntários, os valores da FAO para os poços que continham apenas CTM, considerados como controle, apresentaram oscilações que esperadas para o progresso da diferenciação em osteoblastos, ou seja, aumento entre o 1º e o 14º dia e diminuição entre o 14º e o 21º dia, quando deve ocorrer um aumento da osteocalcina. Os poços contendo CTM + BIO, diferente do controle, apresentaram aumento entre o 1º e o 7º dia, diminuição entre o 7º e o 14º dia e aumento entre o 14º e o 21º dia. Embora estas variações sejam pequenas, este comportamento pode ser explicado somente com análises complementares em relação à interação química entre o biomaterial e as células tronco, responsáveis pelos sinais que induzem a diferenciação e a proliferação.

Segundo Kasten *et al.*, 2008, o tamanho do biomaterial, o tamanho do poro (macro, micro ou nano), a interconectividade entre os poros e a propriedade de adsorção e de absorção do biomaterial são fatores importantes que devem ser analisados, pois influenciam nas interações com as células tronco mesenquimais, resultando em diferenças nos valores dos marcadores bioquímicos em relação aos valores padrão ou aos esperados.

Interessante notar que, na placa referente ao primeiro voluntário que apresentou valor inicial de FAO acima do normal, o comportamento para os poços com CTM e com CTM + BIO foram similares. Este paciente, com alta atividade de fosfatase, auxiliou a diferenciação celular e a sua proliferação.

De forma geral, o biomaterial conseguiu induzir a diferenciação, sem a necessidade de que o meio de diferenciação fosse adicionado.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDUTA (MEV)

A microscopia eletrônica foi realizada a fim de visualizar a formação de osteoblastos e a diferenciação celular. Para tanto, inicialmente, foi analisada a superfície do biomaterial sem a presença de qualquer material sobre o mesmo, como mostrado na figura M da figura 15. Nesta, é possível observar as irregularidades superficiais, as quais podem favorecer a adesão mecânica das células cultivadas sobre o biomaterial..

Muitos estudos têm demonstrado que a topografia, além das propriedades químicas do biomaterial, influenciam na diferenciação osteogênica das células tronco, bem como afetam a mineralização. A superfície rugosa da Anortita, mostrada na figura 15M, é um fator que pode facilitar o crescimento celular *in vivo*, visto que a rugosidade superficial parece controlar o processo de cicatrização dos tecidos e, conseqüentemente, o sucesso do implante (SAWYER, HENNESSY, BELLIS, 2005); (ANSELME, 2000).

O aspecto da superfície mostra não haver ranhuras em direções preferenciais. Neste tipo de superfície, espera-se que o crescimento celular seja desordenado, acompanhando a característica superficial (ANSELME, 2000). Esta característica pode ser observada já no 7º dia de cultivo, onde o crescimento celular foi, visivelmente, desordenado em um padrão diferente do cultivo sobre lâminas (controle).

A figura 15 apresenta todas as imagens do MEV usadas na discussão do trabalho. As imagens correspondentes às letras A, D, G e J mostram o cultivo do 7º dia da cultura das células tronco isoladas do primeiro voluntário, cultivadas sobre lamínulas (A e B) e sobre biomaterial (G e J). É possível observar as formas poligonais ou fusiformes com emissão de diversos prolongamentos típicos de fibras de colágeno e vesículas de minerais, formadas por carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio.

As figuras D e J mostram o aspecto das células cultivadas com meio de diferenciação osteoblástico sobre lâminulas no 7º dia de cultivo. As células também apresentaram uma forma fusiforme ou poligonal, porém com maior quantidade de vesículas minerais, além de uma rede mais concentrada de fibras colágenas cobrindo toda a superfície da lamínula.

A figura G mostra o aspecto das células no 7º dia de cultivo com o meio DMEM sobre o biomaterial, onde é possível observar a formação de prolongamentos que se unem formando uma matriz extracelular.

A figura J mostra as células cultivadas com o meio de diferenciação osteoblástico sobre o biomaterial no 7º dia de cultivo, onde nota-se a presença de uma maior quantidade de vesículas de minerais, quando comparada com as imagens das figuras A, D e G.

A figura B mostra as células cultivadas apenas com meio DMEM e sobre lamínula, ou seja, sem a presença do biomaterial, no 14º dia, onde é possível

observar uma forma típica de osteoblasto com forma poligonal, largura entre 15 e 40 μm e comprimento entre 30 e 90 μm , região achatada ao redor do núcleo e presença de filopodia ou projeções citoplasmáticas formando longas fibras. As vesículas de minerais apareceram depositadas sobre as fibras.

A figura E mostra as células cultivadas com meio de diferenciação sobre lamínula no 14^o dia, onde nota-se uma maior concentração de vesículas minerais em comparação com a imagem da figura B.

As células que cresceram sobre o biomaterial na presença do meio de cultivo apresentaram intensa formação de fibras colágenas e vesículas, revestindo toda a superfície do biomaterial, como pode ser observado na figura H. Um revestimento do biomaterial mais pronunciado, apresentando camadas celulares com muitas fibras e vesículas minerais, ocorreu quando as células foram cultivadas na presença do biomaterial com o meio de diferenciação, como mostra a figura K.

A figura C mostra as células cultivadas com meio de cultivo sobre lamínula, no 21^o dia, onde é possível observar a formação de fibras revestindo toda a superfície da lamínula, constituindo uma matriz extracelular.

A figura F mostra as células cultivadas com meio de diferenciação sobre lamínula no 21^o dia. Como aconteceu no 7^o e 14^o dias de cultivo, as imagens mostram um aumento, porém pouco pronunciado, na quantidade de partículas de fosfato de cálcio devido à presença do meio de diferenciação.

As células cultivadas sobre o biomaterial com o meio de cultivo apresentaram formação intensa de camadas celulares e partículas de fosfato de cálcio revestindo toda a superfície do biomaterial, figura I. Este aspecto foi ainda mais pronunciado quando as células foram cultivadas na presença do biomaterial com o meio de diferenciação, como mostra a figura L.

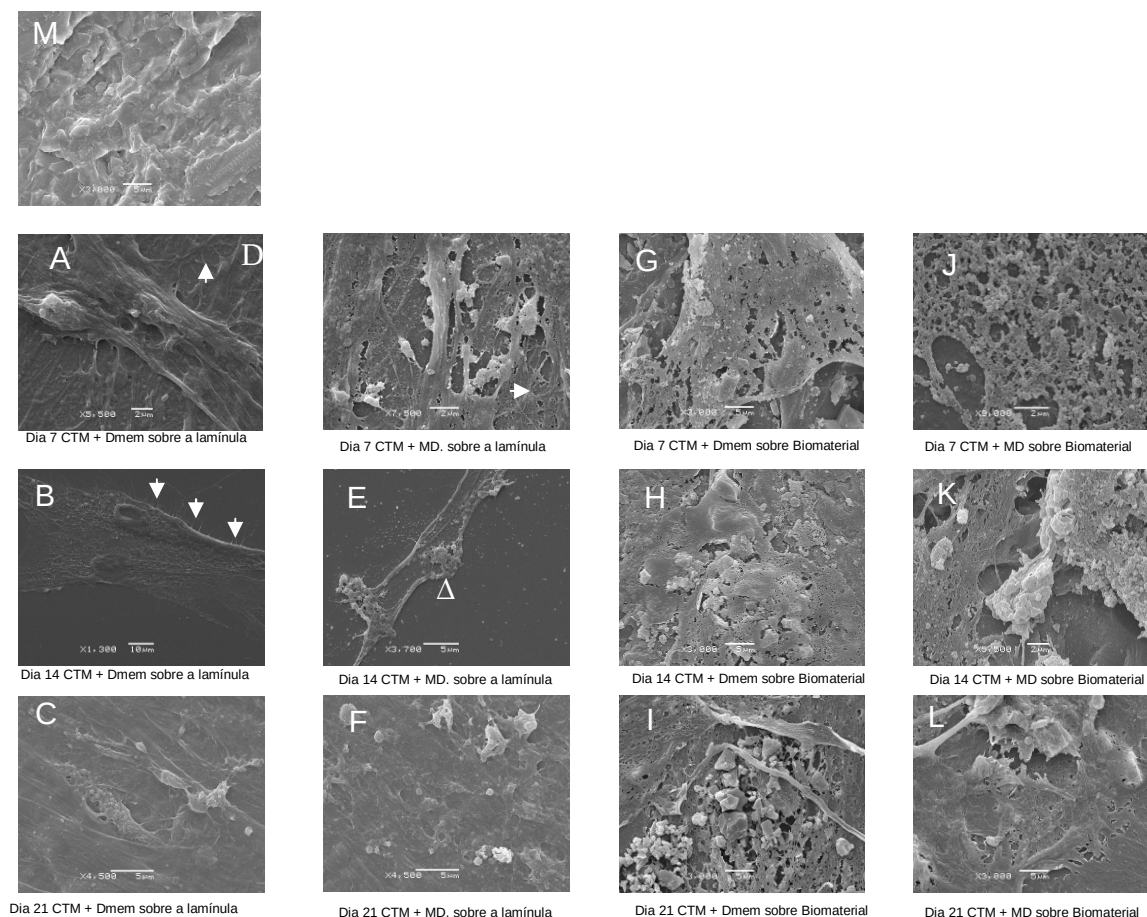


Figura 15. MEV das CTM obtidas da MO, cultivadas sobre lamínulas ou biomaterial no 7º dia (A, D, G, J), 14º dia (B, E, H, K) e 21º dia (C, F, I, L), nas diferentes condições: CTM (A, B, C);

CTM + MD (D, E, F); CTM + BIO (G, H, I); CTM + BIO + MD (J, K, L). Algumas células apresentam formas fusiformes (*) em (B), muitos prolongamentos típicos de fibras colágenas (→) em (A, B, D) e estruturas minerais (Δ) em (C, E, F, H). Na foto B é possível observar, pela marcação (*), duas células com formas típicas de osteoblasto e visível filopodia. Abreviaturas: MEV, microscopia eletrônica por varredura; CTM, células-tronco mesenquimais; MO, medula óssea; BIO, biomaterial; MD, meio de diferenciação osteoblástica.

Para comparar os resultados e facilitar a discussão, algumas figuras foram reproduzidas neste tópico.

No sétimo dia já foi possível verificar o crescimento celular pronunciado sobre o biomaterial como mostra a figura 16.

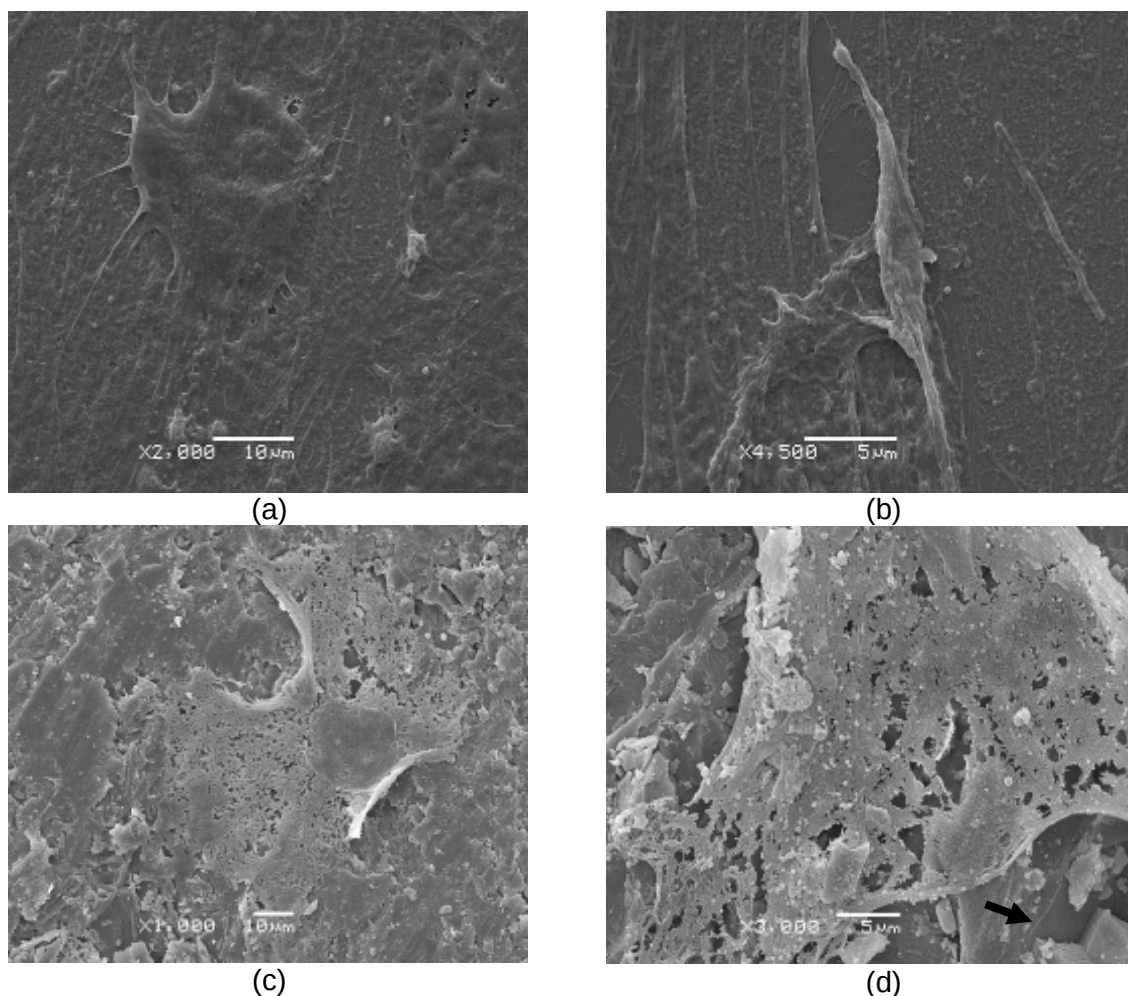


Figura 16. Comparação entre as amostras do 7^o dia, mostrando a proliferação celular mais acentuada sobre o biomaterial. (a) lâmina de vidro + DMEM, 2.000x (b) lâmina de vidro + DMEM, 4.500x (c) BIO + DMEM, 1.000x e (d) BIO + DMEM, 3.000x, mostrando a Anortita sob a camada de células (seta).

No entanto, este crescimento foi melhor visualizado a partir do 14^o dia, figura 17. É possível observar, nesta figura, as multicamadas celulares indicando uma facilidade da diferenciação celular sobre o biomaterial, o que confirma a sua não citotoxicidade. Um padrão de crescimento celular diferente ocorreu no cultivo sobre as lamínulas que apresentaram muitas fibras colágenas direcionadas com formação de poucas vesículas minerais.

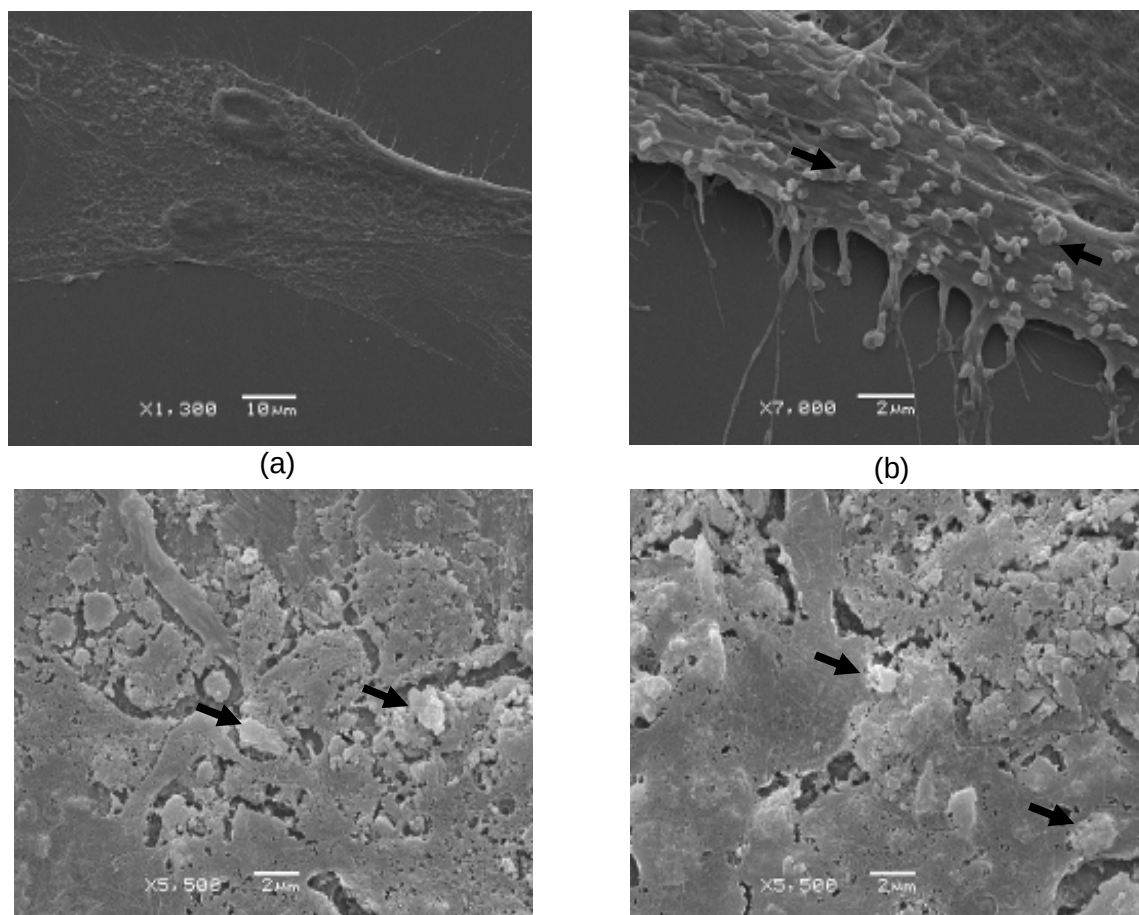


Figura 17. Comparação entre as amostras do 14^o dia, mostrando a proliferação celular mais acentuada sobre o biomaterial e o crescimento de vesículas minerais como as indicadas pelas setas. (a) lâmina de vidro + DMEM, 1.300x (b) lâmina de vidro + DMEM, 7.000x (c) BIO + DMEM, 5.500x e (d) BIO + DMEM, 5.500x.

O MEV é um dos equipamentos usados para mostrar as vesículas e cristais de minerais formados sobre biomateriais. Vesículas de minerais passaram a ser visíveis sobre o biomaterial no 14^o e 21^o dias, figuras 17 e 18 e apareceram em maior número do que sobre a superfície das lamínulas de vidro (controle), indicando que a presença do biomaterial facilitou a formação dessas vesículas minerais, que é uma característica de calcificação, a qual pode ser comparada com o que ocorre *in vivo* (BOSKEY, ROY, 2008).

O aumento do número de vesículas a partir do 14^o dia é uma característica normal nos cultivos celulares para diferenciação em osteoblastos e sugere que a cultura está progredindo para uma alta taxa de mineralização, ou seja, para a formação de osteoblastos (RATISOONTORN *et al.*, 2005).

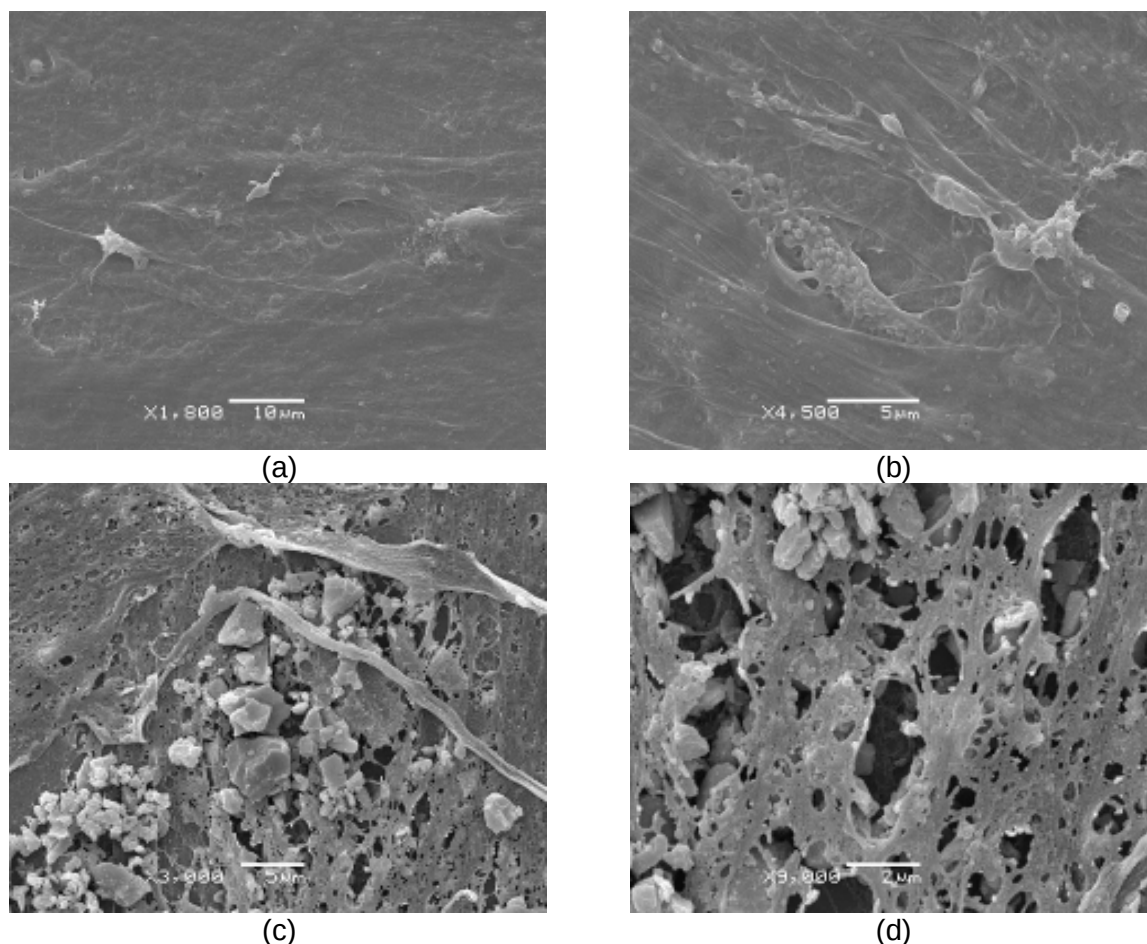


Figura 18. Comparação entre as amostras do 21^o dia, mostrando a proliferação em várias camadas celulares, em um padrão diferente do crescimento sobre a lâmina. (a) lâmina de vidro + DMEM, 1.800x (b) lâmina de vidro + DMEM, 4.500x (c) BIO + DMEM, 3.000x e (d) BIO + DMEM, 9.000x.

Em todos os dias de cultivo analisadas pelo MEV observou-se uma maior mineralização quando as células-tronco foram cultivadas sobre o biomaterial do que sobre a lâmina. Pode-se concluir, portanto, que o biomaterial teve influência positiva no processo de diferenciação celular, ou seja, o biomaterial interage mecânica e biomecanicamente com as células tronco de forma a induzir a sua diferenciação em osteoblastos (GEORGE, YOSHINORI, MIYATA, 2006). Esta interação pode ser identificada quando se compara a quantidade de vesículas formadas no 21^o dia de cultivo sobre o biomaterial, último dia de análise, com e sem meio de diferenciação, figura 19. A presença do meio de diferenciação parece não ter influenciado o processo de mineralização sobre o biomaterial.

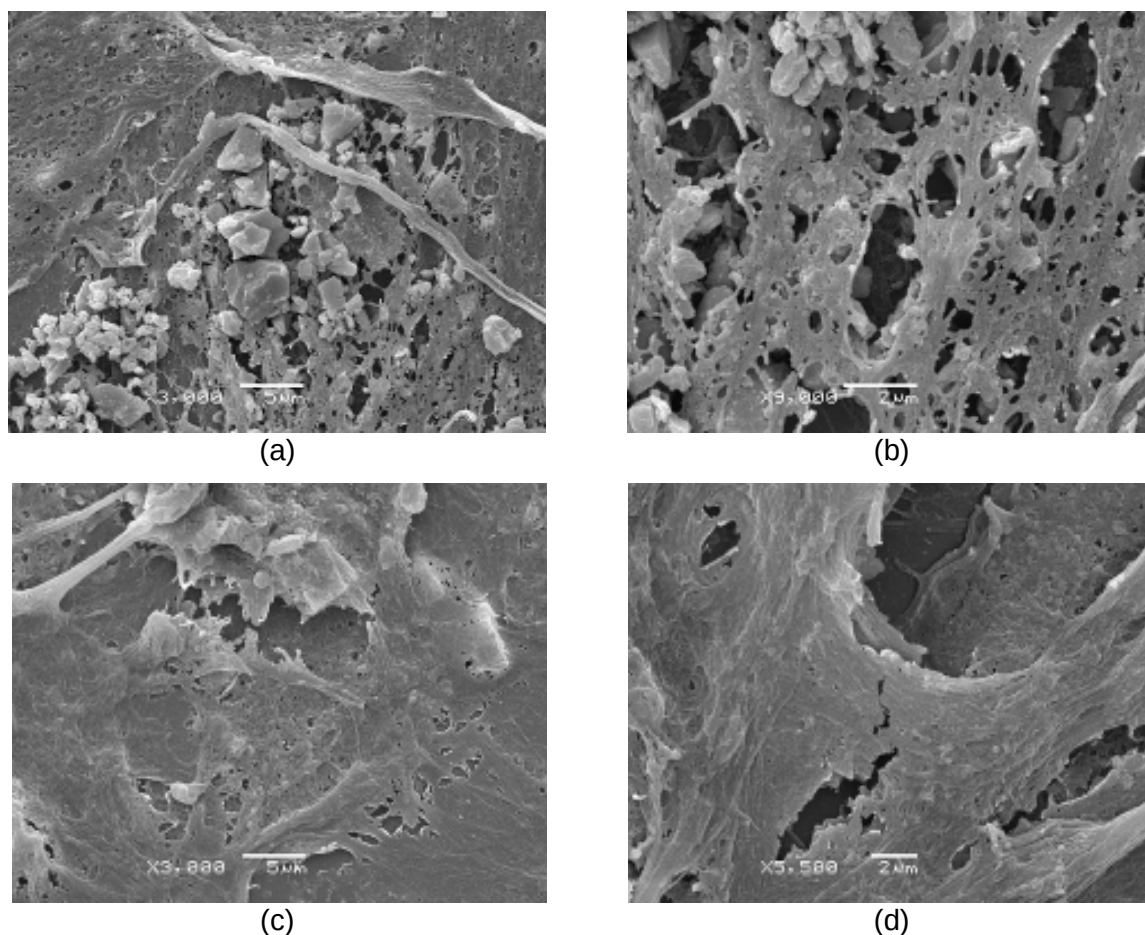


Figura 19. Comparação entre as amostras do 21^o dia de cultivo sobre a Anortita, mostrando a proliferação celular. (a) BIO + DMEM, 3.000x (b) BIO + DMEM, 9.000x (c) BIO + DMEM + MD, 3.000x e (d) BIO + DMEM + MD, 5.500x.

As vesículas minerais com formas ovais arranjadas em aglomerados na superfície celular, uma característica comum às células que tenham se diferenciado em osteoblastos, são frequentes nas células cultivadas por 21 dias na presença do biomaterial. Além disso, essas células passaram a apresentar uma morfologia fusiforme, ou seja, largas no centro e afinadas nas pontas, características também comuns a osteoblastos, precursoras dos osteócitos, células maduras que constituem a matriz óssea (YIN, LI, 2006; BALONI *et al.*, 2009; VALENCIA, GRETZER, COOPER, 2009). Este padrão de diferenciação mostrou-se comum neste estudo quando as CTMs foram cultivadas na presença da Anortita por até 21 dias. Entretanto, não existem estudos conclusivos sobre como as propriedades químicas de um biomaterial, a sua energia e rugosidade superficiais influenciam no comportamento e no padrão de diferenciação dos osteoblastos. Neste trabalho, este padrão é visivelmente diferente entre a superfície do biomaterial e a superfície da lamínula de vidro.

No final do cultivo, é possível inferir sobre o sucesso da mineralização *in vitro* a qual, segundo Ciapetti, 2006, é considerada uma evidência definitiva do potencial osteogênico e, normalmente, aparece como nódulos tridimensionais observados após a organização das células em multicamadas, configuração observada com clareza nas figuras 19a e 19b, ou como uma calcificação difusa, sem identificação clara de nódulos como aparece nas figuras 19c e 19d.

Como a avaliação da capacidade osteoindutora do biomaterial é realizada de forma mais segura, pela quantidade de matriz mineralizada formada sobre o mesmo, caracterizando o final da diferenciação em osteoblastos (DECLERCQ *et al.*, 2005), considerando este aspecto, é possível sugerir que o biomaterial mostrou ser osteoindutor.

4.3 CITOQUÍMICA

A análise da citoquímica foi realizada no 7^o, 14^o e 21^o dias de cultivo com a finalidade de se detectar cristais de cálcio que aparecem na forma de pequenos pontos escuros ao redor das células, como pode ser observado na figura 20, de A a F.

Especificamente, o vermelho de alizarina no pH 4,2 detecta fosfato e carbonato de cálcio, e no pH 7,0 detecta oxalato de cálcio, cristais aciculares, ambos cristais contidos nos osteoblastos (SALDAÑA *et al.*, 2009), sendo que os fosfatos de cálcio participam do processo de mineralização e o oxalato de cálcio é um produto final do metabolismo (STRZELECKI, MENON, 1985).

Dessa forma, a citoquímica torna-se uma importante ferramenta metodológica na evidência da diferenciação de CTMs em osteoblastos, o que pode vir a ser um dado relevante na confirmação do processo de diferenciação celular aqui investigado.

As figuras 20A e 20B mostram a citoquímica do 7^o dia, em pH 4,2 e pH 7,0. No controle, foto do canto superior direito, foi possível a visualização das células sem presença de cristais de fosfato cálcio, no entanto, os cristais de minerais foram mais visíveis quando foi acrescentado o meio de diferenciação

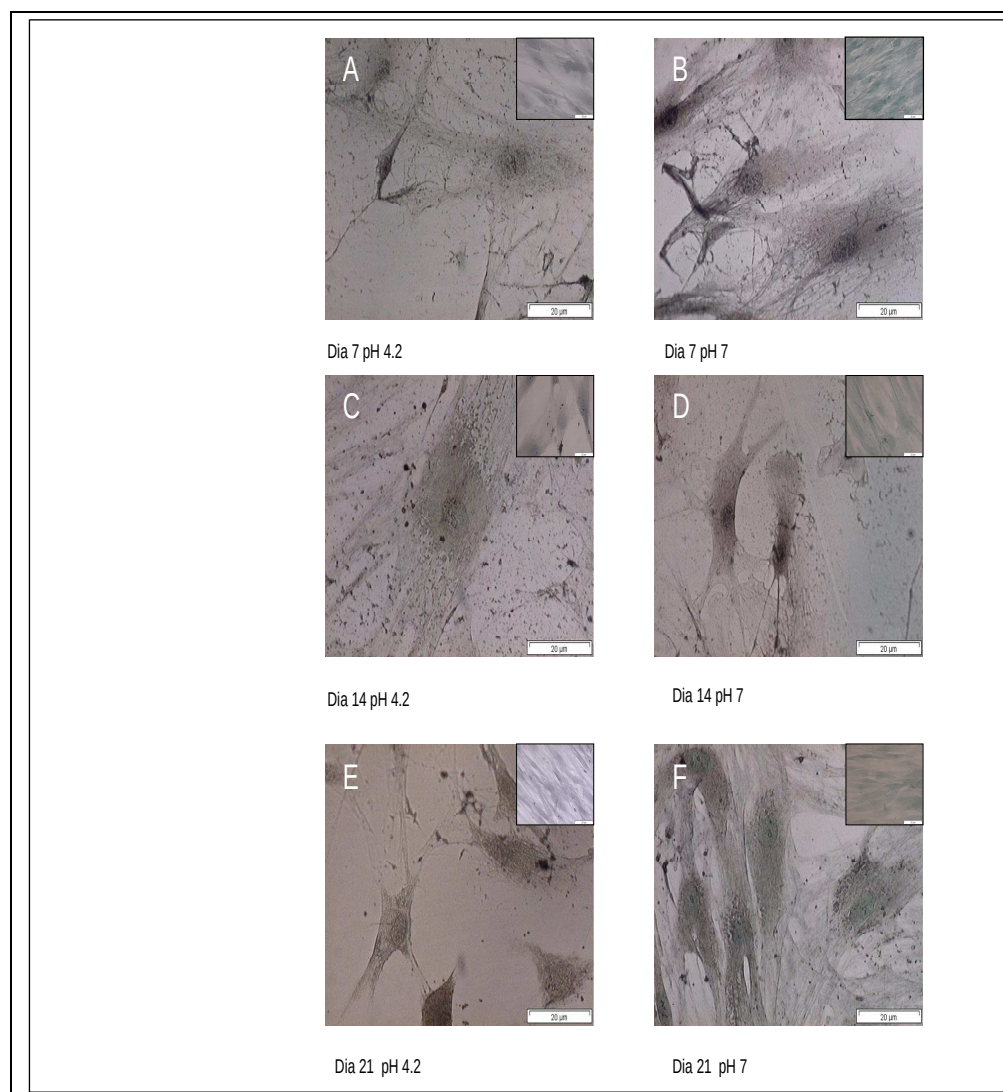


Figura 20. Citoquímica das CTMs, cultivadas sobre lamínulas na presença de MD, no 7° (A, B), 14° (C, D) e 21° (E, F) dias. As células controle, cultivadas sem presença de MD estão representadas no canto superior direito. As células foram coradas com o corante Alizarina S, em pH 4,2 (A, C, E) e pH 7,0 (B, D, F), evidenciando cristais de fosfato de cálcio e oxalato e carbonato de cálcio, respectivamente (→). Aumento 400X. Abreviaturas: CTM, células tronco mesenquimais; MD, meio de diferenciação.

Nas lamínulas das culturas realizadas em pH 7,0, observa-se que houve a formação de cristais de oxalato de cálcio, pontos escuros dispersos nas imagens, somente com a presença do meio de diferenciação (coluna da direita), independente do dia de cultivo. O mesmo comportamento foi observado nos cultivos em pH 4,2, ou seja, a formação dos cristais de fosfato de cálcio, também representados pelos pontos escuros, só ocorreu em presença do MD.

Portanto, as CTMs não produzem cristais de oxalato de cálcio ou de fosfato de cálcio, compostos dos osteoblastos, sem que sejam estimuladas, neste caso, por

um agente químico indutor. Isto leva à conclusão de que a diferenciação das CTMs em osteoblastos quando cultivadas sobre a Anortita sem a presença do MD, foram resultado unicamente da influência da Anortita, ou seja, os resultados da citoquímica sugerem fortemente que este biomaterial tem a capacidade de induzir a diferenciação das CTMs em osteoblastos, ou ainda, que a Anortita é osteoindutora.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- Ocorreu adesão celular sobre a Anortita, comprovada pela diferenciação das CTMs em prováveis osteoblastos, evidenciados por características ultraestruturais, citoquímicas e morfológicas;
- A Anortita induziu a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos, sem a presença do meio de diferenciação, sugerindo fortemente ser este um biomaterial osteoindutor;
- Através do estudo *in vitro* do cultivo de CTMs em presença da Anortita, este biomaterial mostrou ser biocompatível, já que quaisquer alterações morfológicas e bioquímicas indicativas de sofrimento celular foram verificadas pelos métodos utilizados;
- O cultivo de células tronco mesenquimais sobre a Anortita, como candidata a aplicações na área médica, mostrou ser um procedimento chave para determinar o sucesso do biomaterial, antes de sua implantação;
- A constatação da biocompatibilidade da Anortita justifica investimentos futuros para a sequência do estudo em ensaios *in vivo* e pré-clínicos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- α) Avaliar a capacidade osteocondutora do biomaterial por meio da análise em MEV, citoquímica e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) na seção transversal do biomaterial cultivado;
- β) Avaliar o efeito da porosidade e da topografia e rugosidade superficiais na resposta celular, tanto de proliferação quanto de diferenciação;
- χ) Quantificar a produção da osteocalcina, proteína sintetizada somente por osteoblastos maduros e, assim, inferir a quantidade de tais células;
- δ) Realizar ensaios *in vivo* a fim de confirmar os resultados *in vitro* e preparar o biomaterial para os ensaios pré clínicos.

REFERÊNCIAS

- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681, 2000.
- ARINZEH, T. L. Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. **Foot and Ankle Clin.**, v. 10, p. 651-655, 2005.
- BADYLAK, S. F.; The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials**, v. 28, p. 3587-3593, 2007.
- BALLONI, S. et al. Effects of titanium surface roughness on mesenchymal stem cell commitment and differentiation signalling. **Int J Oral & Maxillofacial Imp**, v. 24, p. 627-635, 2009.
- BARRÉRE, F.; BLITTERSWIJK, C. A.; GROOT, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Int J Nanomed**, v. 1, p. 317-332, 2006.
- BERNARDO, M. E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W. E. Mesenchymal Stromal Cells. A novel treatment modality for tissue repair. **Annals New York Acad Sciences**, v. 1176, p. 101-117, 2009.
- BLOM, A. Wich scaffold for which application. **Cur Orthop**, v. 21, p. 280-287, 2007.
- BOSKEY A. L.; ROY, R. Cell culture systems of bone and tooth mineralization. **Chem. Rev.**, v. 11, p. 4716-4733, 2008.
- BOSTROM, M. P. G.; SEIGERMAN, D. A. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. **HSSJ**, v. 1, p. 9-18, 2005.
- BROVARONE, C. V. *et al.* Development of glass ceramic scaffold for bone tissue engineering: Characterisation, proliferation of human osteoblast and nodule formation. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 199-208, 2007.
- CARDOSO, M.J.L. Homeostase do cálcio e marcadores do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino – revisão. **Arch Vet Sc**, v. 12, n. 1, p. 17-27, 2007.
- CARSON, J. S.; BOSTROM, M. PG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. **Int. J. Care Injured**, v. 38, p. 33-37, 2007.
- CAVALHEIRO, L.B.B. Estudo da biocompatibilidade e tempo de degradação de vitrocerâmico inteligente para aplicação em implantes. 2005. 75p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2005.
- CHANDLER, R. L. *et al.* *Bmp2* transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. **Molec Cel Biol**, v. 27, p. 2934-2951, 2007.

CHEN, Y. *et al.* Beta-Catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. **Plos Medicine**, v. 4, p. 1216-1229, 2007.

CIAPETTI, G., *et al.* Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 36, p. 6150-6160, 2006.

DAWSON, E. *et al.* Biomaterials for stem cell differentiation. **Adv Drug Del Reviews**, v. 60, p. 215-228, 2008.

DECLERCQ, H. *et al.* Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p.4964-4974, 2005.

DROSSE, I. *et al.* Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. **Int. J. Care Injured**, v. 39, p. 9-20, 2008.

EAGAN, M. J.; Mc ALLISTER, D. R. Biology of allograft incorporation. **Clin Sports Med.**, v. 28, p. 203-214, 2009.

GADGET, D.D.S. Porous Block Allograft from Zimmer Dental. Disponível em: <<http://www.ddsgadget.com/ddsgadgetwp/dental-products/bone-grafting-for-dental-implants/puros-block-allograft>>. Acesso em 20 mar. 2009.

GALLER, R.M.; SONNTAG, V.K.H. Bone Graft Harvest. **Barrow Quarterly**, v. 19, n. 4, 2003. Disponível em: <http://www.thebarrow.org/Education/Barrow_Quarterly/Vol_19_No_4_2003/158516>. Acesso em 20 mar. 2009.

GALLI, C. *et al.* Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. **J. Periodontol**, v. 76, p. 364-372, 2005.

GEORGE, J.; KUBOKI, Y.; MIYATA, T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. **Biotech Bioeng**, v. 95, n. 3, p. 404-411, 2006.

GOMAR, F. *et al.* P-15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial. **Int Orthop**, v. 31, p. 93-99, 2007.

GUTIERRES, M. *et al.* Substitutos ósseos. **Arq Med**, v. 19, p. 153-162, 2006.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Adv Drug Del Rev.**, v. 59, p. 234-248, 2007.

HENNESSY, K. M. *et al.* The effect of collagen 1 mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. **Biomaterials**, v. 30, p. 1898-1909, 2009.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, 2008. 1670 p.

HUBER, F. *et al.* First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste ostim in human cancellous bone. **BMC Musculoske Dis.**, v. 7, p. 1-14, 2006.

HSU *et al.* Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Biochem Pharmac**, v. 7, n. 3, p. 504–514, 2007.

ILMER, M. *et al.* Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng.**, v. 15, p. 1-13, 2009.

JONES, A. C. *et al.* The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. **Biomaterials**, v. 30, p. 1440-1451, 2009.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T. Behaviour of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. **J Biomat Appl**. v. 23, p. 197-212, 2008.

KASTEN, P. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. **J Biomat Appl**, v. 23, p. 169-188, 2008.

KHANG, D. *et al.* Selective adhesion and mineral deposition by osteoblasts on carbon nanofiber patterns. **Int J Nanomed**, v. 1, p. 65-72, 2006.

KHONG, L. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. **J Biomat Appl**, v. 22, p. 223-239, 2007.

KHOSLA, S.; WESTENDORF, J. J.; JO OURSLER M. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. **J Clin Invest**, v. 118, p. 421-428. 2008.

KIM, J. *et al.* Potential of hydrogels based on poly (ethylene glycol) and sebacic acid as orthopedic tissue engineering scaffolds. **Tissue Eng**, v. 15, p. 1-9, 2009.

LANZA, R. Handbook of Stem Cells. Vol. 2 - Adult and Fetal Stem Cells. Elsevier Academic Press, 2004, p. 13-16, p. 301-304.

LICKORISH, D.; GUAN, L.; DAVIES, J. E. A three-phase, fully resorbable polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. **Biomaterials**, v. 28, p. 1495-1502, 2007.

MANJUBALA, I. *et al.* Growth of osteoblast-like cells on biomimetic apatite-coated chitosan scaffolds. **J. Biomed. Mater Res B. Appl. Biomater**, v. 84, p. 7-15, 2008.

MANO, J. F. *et al.* Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **J. R. Soc. Interface**, v. 4, p. 999-1030, 2007.

MARCACCI, M. *et al.* Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng**, v. 13, p. 947-955, 2007.

MEDLINEPLUS. Medical Encyclopedia. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/presentations/100136_3.htm>. Acesso em: 20 mar. 2009.

MUSINA, R. A.; YEGOROV, Ye. Ye.; BELYAVSKY, A. V. Stem cells: properties and prospective medical applications. **Molec Biol**, v. 38, p. 563-577, 2004.

NGIAM, M. *et al.* Fabrication of mineralized polymeric nanofibrous composites for bone graft materials. **Tissue Engineering**, v. 15, p. 535-546, 2009.

OLMO, L. M. *et al.* In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 1104-1113, 2008.

OREFFO, R.O.C.; TRIFFITT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, v. 25, n. 2, p.5S-9S, 1999.

PALMER L. C. *et al.* Biomimetic Systems for hidroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. **Chem Rev.**, v. 108, p. 4754-4783, 2008.

PATEL, M. M.; CATALANO, L. W. Bone graft substitutes: Current uses in hand surgery. **JHS**, v. 34, p. 555-556, 2009.

PETERSEN, B.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. The perspectives for porcine to human xenografts. **Comp. Immun. Infect. Dis.**, v. 32, p. 91-105, 2009.

PHILLIPS, J. E. *et al.* Human mesenchymal stem cell differentiation on self-assembled monolayers presenting different surface chemistries. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 12-20, 2010.

PINHEIRO, T. C. ET AL. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. **Rev Bras Ortop.**, v. 43, n. 10, p. 433-441, 2008.

PORTER, J. R.; HENSON, A.; POPAT, K. C. Biodegradable poly (E-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 30, p. 780-788, 2009.

PROIA, A.D.; BRINN, N.T. Identification of calcium oxalate crystals using Alizarin Red S stain. **Arch Pathol Lab Med**, v. 109, n. 2, p.186-19, 1985.

RATISOONTORN, C. *et al.* In vitro differentiation profile of osteoblasts derived from patients with Saethre–Chotzen syndrome. **Bone**, v. 36, n. 4, p. 627-634, 2005.

REBELATTO, C. K. *et al.* Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Society for Experimental biology and Medicine*. P. 901-913, 2007.

REICHERT, J. C. *et al.* The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials.**, v. 30, p. 2149-2163, 2009.

RODRIGUES, F. L.; MERCADANTE, M. T. Tratamento da falha óssea parcial pelo transporte ósseo parietal. **Acta Ortop Bras.**, v. 13, n. 1, p. 9-12, 2005.

SALDAÑA, L. *et al.* Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1294-1305, 2009.

SANTIAGO, A. S. *et al.* Response of osteoblastic cells to titanium submitted to three different surface treatments. **Braz Oral Res**, v. 19, p. 203-208, 2005.

SAWYER, A.A.; HENNESSY, K.M.; BELLIS, S.L. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins. **Biomaterials**, v. 26, p. 1467–1475, 2005.

SHIKINAMI, Y. *et al.* Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction. **J Royal Soc Interface**, v. 3, p. 805-821, 2006.

SMITH, L. A. *et al.* The influence of three dimensional nanofibrous scaffolds on the osteogenic differentiation of embryonic stem cells. **Biomaterials**, v. 30, p. 2516-2522, 2009.

SOUSA, R. C *et al.* A clinical report of bone regeneration in maxillofacial surgery using bone like synthetic bone graft. **J Biomat Appl**, v. 22, p. 373-385, 2008.

STEVENS, M. M. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. **PNAS.**, v. 102, p. 11450-11455, 2005.

STRZELECKL, T.; MENON, M. The uptake of oxalate by rat liver and kidney mitochondria. **J Biol Chem**, v. 261, n. 26, p. 12197-12201, 1986.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

TORNIER. OsteoCure Scaffold Wedges. Disponível em: <<http://tornierdx.com/osteocure/index.php>>. Acesso em 20 mar. 2009.

VALENCIA, S.; GRETZER, C.; COOPER, L. F. Surface nanofeature effects on titanium-adherent human mesenchymal stem cell. **Inter J Oral & Maxillofacial Impl**, v. 24, p. 38-46, 2009.

WANG, W. *et al.* 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 30, p. 2705-2715, 2009.

XU, H. H. K.; WEIR, M. D.; SIMON Jr., C. G. S. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration. **Dental Mat**, v. 24, p. 1212-1222, 2008.

YIN, T.; LI, L. The stem cell niches in bone. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 1195–1201, 2006.

YUAN, Q. *et al.* Effect of combined application of bFGF and inorganic polyphosphate on bioactivities of osteoblasts and initial bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1716-1724, 2009.

ZHANG, Z. *et al.* A biaxial rotating bioreaction for the culture of fetal mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 2694-2704, 2009.

ANEXO A – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Parecer Nº **0002571/09**

Protocolo CEP Nº **2792**

Título do projeto **ESTUDO DA CAPACIDADE OSTEOGÊNICA EM BIOVITROCERÂMICO ABSORVÍVEL**

Grupo
Versão **3**

Protocolo CONEP **0541008400008**

Pesquisador responsável **BEATRIZ LUCI FERNANDES**

Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

Recomendações

Embora o protocolo verse sobre o uso de material humano já coletado para outro estudo, este já autorizado pelos pacientes, recomenda-se fazer constar do TCLE os telefones dos pesquisadores.

Conclusões

Pela aprovação.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **08/04/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 08 de Abril de 2009.



Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUCPR



ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA CAPACIDADE OSTEOGÊNICA EM BIOVITROCERÂMICO ABSORVÍVEL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 - Eu, _____, RG, _____, entendo que estou sendo portador de Cardiopatia Dilatada, uma doença que acomete o músculo do coração causando sua dilatação e comprometendo a capacidade do coração de bombear sangue para o restante do corpo causando sensações de fraqueza, canseiras e falta de ar e estou sendo convidado a participar do projeto chamado: "Estudo da capacidade osteogênica em biovitrocerâmico absorvível" e que a minha participação é voluntária.

2 – As células-tronco mesenquimais são células que possuem grande capacidade de se dividir e de se transformar em outros tecidos do corpo, como ossos, nervos, músculos e sangue. Devido a estas características, as células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas para a recuperação de tecidos danificados como em caso de fraturas e de doenças ósseas apresentando um potencial para a aplicação terapêutica. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com o Instituto de Grade de Ciências Básicas (IGCB) e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e que os médicos e pesquisadores estão empenhados na pesquisa básica da capacidade das células-tronco mesenquimais que se encontram na medula óssea em se transformar em células adultas de tecidos ósseos e a sua capacidade de integração com o biovitrocerâmico absorvível.

3 – O biovitrocerâmico absorvível é um biomaterial que será testado em laboratório para a possível utilização no reparo do tecido ósseo danificado, como por exemplo, em enxertos ósseos.

4 - Eu entendo que do volume total da **medula óssea** coletada para o projeto "Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias-Cardiopatia Dilatada", serão retirados 5 ml para serem destinados para a pesquisa "Estudo da capacidade osteogênica das células-tronco mesenquimais em biovitrocerâmico absorvível". As células obtidas destes 5 ml de medula óssea serão apenas estudadas em laboratório e **não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial.**

5 – Eu entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar a minha identidade.

6 - Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, ____ / ____ / ____

Assinatura do participante = _____

Assinatura do responsável = _____

Assinatura do pesquisador responsável = _____
 Profa. Dra. Beatriz L. Fernandes

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR
 R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho
 CEP 80215- 901–Curitiba –PR – Brasil. Tel: +55 41 3271-1657