

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

**A Utilização do Cimento de Fosfato de Cálcio como Arcabouço para
Engenharia de Tecido Ósseo: Estudo *In Vitro***

TAÍS SOMACAL NOVAES SILVA

Porto Alegre
2009

TAÍS SOMACAL NOVAES SILVA

**A UTILIZAÇÃO DO CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO COMO ARCABOUÇO
PARA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO: ESTUDO *IN VITRO***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Cantarelli Machado

PORTO ALEGRE

2009

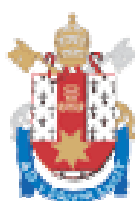


DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Luiz** e **Gilmara** e ao meu irmão **Tiago**, pela confiança, dedicação e amor a mim confiados. Vocês serão sempre o meu porto seguro.

Ao meu esposo **Aurelício**, por dividir comigo as alegrias e dificuldades desta caminhada. Teu apoio e incentivo foram fundamentais para que eu concluísse mais esta etapa.

A minha filha **Luísa**, por me ensinar o verdadeiro significado da palavra amor.



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

Obrigada Senhor por me permitires concluir mais esta etapa de minha formação profissional. Estivestes comigo nos momentos de ansiedade e cansaço, agora, nada mais justo do que oferecer a Ti, este momento de alegria!

À minha orientadora, **Profª Drª Denise Cantarelli Machado**, meu agradecimento sincero pela orientação segura, pela disponibilidade e pelos momentos de descontração vivenciados. Foi muito bom contar com tua orientação nestes dois anos de mestrado e quatro anos de doutorado, és para mim um exemplo de pesquisadora!

À **Profª Drª Marília Gerhardt de Oliveira**, meu reconhecimento e admiração por sua trajetória junto a este programa de Pós-Graduação. Obrigada pela confiança, pelo apoio incondicional e pela amizade pessoal.

Aos colegas de doutorado **Aírton Chaves Jr., Ana Cláudia Lustosa, Bruna Fronza, Henrique Ramos de Oliveira e Otacílio Chagas Jr.**, pela amizade construída, pela troca de conhecimentos e pelos agradáveis momentos vivenciados juntos. Meus votos de sucesso a todos!

Ao biólogo **Christian Viezzer**, o meu agradecimento pelo prestimoso auxílio na parte laboratorial desta pesquisa. Obrigada pela paciência e solicitude sempre demonstradas.

Ao Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS – CEMM, na pessoa de sua coordenadora, **Profª Drª Berenice Anina Dedavid**, e em especial à funcionária **Miriam** pela disposição e presteza com que sempre me atendeu.

Ao **Prof. Dr. Luís Alberto Santos**, grande entusiasta da pesquisa e utilização do cimento de fosfato de cálcio, meu agradecimento pelo incentivo, pela disponibilidade e paciência sempre demonstradas.

A Faculdade de Odontologia da PUCRS, na pessoa do seu diretor **Prof. Marcos Túlio Mazzini de Carvalho**, pela excelência do ensino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, na pessoa de seu coordenador, **Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**.

A **PUCRS**, instituição responsável por minha formação enquanto cirurgiã-dentista, desde a graduação até o doutorado, na pessoa de seu magnífico reitor, **Ir. Joaquim Clotet**.

Aos **Professores** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS.

Aos **Funcionários** da Faculdade de Odontologia da PUCRS, em especial a Ana, Marcos, Carlos e Davenir pela gentileza com que sempre me trataram.

À **Capex**, pelo financiamento deste curso de pós-graduação.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

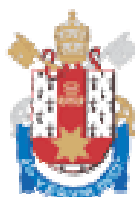


RESUMO

RESUMO

A engenharia tecidual tem se mostrado um campo promissor para a reabilitação de pacientes com traumas ou deformidades faciais que necessitem de áreas extensas de enxerto ósseo. Seu princípio básico envolve a associação de um tipo apropriado de célula e de um arcabouço biocompatível e bioabsorvível que mimetize funcional e estruturalmente determinado tipo de tecido. O Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC) aparece como uma alternativa viável de biomaterial a ser utilizado com esta finalidade em virtude de suas características como biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a capacidade de suportes tridimensionais macroporosos de CFC, confeccionados com matérias-primas brasileiras, de permitir a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana. Para isso, células obtidas da crista ilíaca de um doador humano adulto foram rotineiramente processadas até as condições experimentais e, a seguir, cultivadas sobre suportes de CFC, macroporosos, que tiveram como corpo gerador de poros, microesferas de parafina, com tamanho entre 100 e 250µm. Para indução das células em linhagem osteogênica foi acrescentada Proteína Morfogênica Óssea (BMP4) ao meio de cultura. Os períodos de cultura estabelecidos foram de cinco, dez e 15 dias. Após estes períodos, o comportamento e a morfologia das células junto ao biomaterial foram avaliados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. Os níveis de expressão dos genes *BGLA* e *SSP1*, que codificam as proteínas osteocalcina (OC) e osteopontina (OP) respectivamente, bem como a atividade da Fosfatase Alcalina (ALP), outro marcador osteoblástico importante, foram quantificados pela técnica de PCR em Tempo Real (QT-PCR) utilizando o fluoróforo SYBR Green[®]. O QT-PCR detectou a expressão dos genes *BGLA* e *SSP1* e a atividade da fosfatase alcalina nos períodos de 10 e 15 dias de cultura, o que nos permitiu constatar que houve proliferação celular e diferenciação destas em células osteogênicas. No período de cinco dias, não foi observada a expressão de nenhum dos genes investigados. A partir destes resultados concluímos que o CFC, macroporoso, com tamanho de poros entre 100 e 250µm, criados por meio da utilização de microesferas de parafina, permite a adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em células osteogênicas, podendo ser utilizado como arcabouço para engenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: Cimento de Fosfato de Cálcio, Células-Tronco Mesenquimais, Engenharia de Tecido Ósseo.



ABSTRACT

ABSTRACT

Tissue engineering has been showing a promising approach on the treatment of patients with trauma or facial deformities that need extensive areas of bone grafts. It involves the association of an appropriate kind of cell and a biocompatible and biodegradable scaffold that imitates functionally and structurally a specific kind of tissue. Calcium Phosphate Cement (CFC) appears as an interesting alternative of biomaterial to be used as a scaffold due to its characteristics as biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity. Thus, the aim of the present study was to evaluate the ability of macroporous tridimensional CFC scaffolds, made with brazilian raw-material, to allow the adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells, derived from human bone marrow in cells osteogenic lineage. For that, cells obtained from iliac crest of an adult human donor were routinely processed until experimental conditions and, after that, cultured over CFC discs, macroporous that had as poror generation body, paraffin spheres, with size between 100 and 250µm. For the induction of cells in osteogenic lineage, BMP4 was added to the culture. Culture periods were established in five, ten and fifteen days. After these periods cells were evaluated due to their morphology by Scanning Electron Microscopy. The expression levels of genes *BGLA* and *SSP1*, that codify the osteocalcine (OC) and osteopontine (OP) proteins, as well as the Alkaline phosphatase activity (ALP), other important osteoblastic marker , were quantified by the PCR technique in real time (QT-PCR) using the fluorophore SYBR GREEN[®] . The QT-PCR detected the expression of the genes *BGLA* and *SSP1* and the alkaline phosphatase activity in the periods of 10 and 15 days of culture, what permitted them to check that had a cell proliferation and the differentiation of it in osteogenic cells. In the period of five days, it was not observed the expression of any observed genes. From theses results we concluded that the macroporous CFC, with pore size between 100 and 250 µm, created through the utilization of the paraffin microspheres, permits the adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells and can be used as an scaffold to the bone tissue engineering.

Keywords: Calcium Phosphate Cement, Mesenchymal Stem Cells, Bone Tissue Engineering



LISTA FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Desenvolvimento da célula óssea..... | 34 |
| Figura 2: Discos de Cimento Ósseo de Fosfato de Cálcio..... | 42 |
| Figura 3 : Fotomicrografia de MEV mostrando as esferas de parafina utilizadas na confecção de poros no cimento..... | 43 |
| Figura 4: Colocação dos arcabouços de CFC na placa de poliestireno de 24 poços. | 44 |
| Figura 5: Remoção de medula óssea humana da crista do osso íliaco | 45 |
| Figura 6: Aparelho iCYCLER (BIO-RAD) para amplificação do cDNA do QT-PCR. 48 | |
| Figura 7: Fotomicrografias eletrônicas da superfície macroporosa de CFC..... | 51 |
| Figura 8: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC no 5º dia de cultura.. | 52 |
| Figura 9: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC no 10º dia de cultura.. | 53 |
| Figura 10: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC no 15º dia de cultura. | 54 |
| Figura 11: Desenvolvimento das células de medula óssea nos diferentes períodos de cultura sem a presença dos arcabouços..... | 56 |



LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|---|
| % | Por cento |
| ® | Marca Registrada |
| °C | Graus Celsius |
| ALP | Atividade da Fosfatase Alcalina |
| BMP | Proteína Morfogênica Óssea |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CFC | Cimento de Fosfato de Cálcio |
| C _T | Cycle Threshold |
| CTM | Célula-tronco mesenquimal |
| DNA | Acido desoxirribonucléico |
| dNTPS | Desoxirribonucleotideos trifosfatados |
| DMEM | Meio Eagle modificado por <i>Dulbecco</i> |
| DNase | Deoxirribonuclease |
| DPBS | <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| GLA | Ácido Gama-carboxiglutâmico |
| h | Hora |
| HA | Hidroxiapatita |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | milimolar |
| µm | micrômetro |
| µl | microlitro |
| MPa | Megapascal |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| n | Número |
| Na ₂ SO ₄ | Sulfato de Sódio |
| ng | nanograma |

| | |
|---------------|--|
| OP | Osteopontina |
| OC | Osteocalcina |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PP | Placas Petalóides |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| PVA | Poli álcool vinílico |
| QT-PCR | PCR em Tempo Real |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Rotações por minuto |
| Taq | Bactéria <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCP | Fosfato tricálcico |
| α -TCP | alfa- fosfato tricálcico – α $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| β -TCP | beta- fosfato tricálcico |
| U | Unidade |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| ULBRA | Universidade Luterana do Brasil |

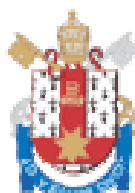


SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 REVISTA DA LITERATURA | 25 |
| 2.1 ENGENHARIA TECIDUAL | 25 |
| 2.2 CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO..... | 28 |
| 2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS | 32 |
| 2.4 PCR E PCR EM TEMPO REAL | 35 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 GERAL | 39 |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 39 |
| 4 METODOLOGIA | 41 |
| 4.1 ASPECTOS BIOÉTICOS | 41 |
| 4.2 CONFECÇÃO DOS ARCABOUÇOS | 41 |
| 4.3 DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 44 |
| 4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA | 45 |
| 4.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES BGLA, SSP1 E FOSFATASE ALCALINA | 46 |
| 4.5.1 Obtenção do RNA total das amostras | 46 |
| 4.5.2 Transcrição Reversa para Obtenção dos cDNA's | 47 |
| 4.5.3 Técnica da PCR em Tempo Real (QT-PCR) | 48 |
| 4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 49 |
| 5 RESULTADOS | 51 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS | 51 |
| 5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 52 |
| 5.3 PCR EM TEMPO REAL PARA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS OP, OC E ALP | 54 |
| 5.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR NOS POÇOS SEM ARCABOUÇO | 56 |
| 6 DISCUSSÃO | 59 |
| 7 CONCLUSÕES | 65 |
| REFERÊNCIAS | 67 |

| | |
|--|-----------|
| ANEXO A – Aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - protocolo nº 0064/05 | 75 |
| ANEXO B – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS – protocolo nº 05/02882 CEP | 76 |
| ANEXO C – Termo de Consentimento Informado | 77 |



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ressecções de tumores, traumas, anormalidades esqueléticas ou atrofias causam, muitas vezes, defeitos ósseos extensos na região maxilofacial que devem ser tratados a fim de garantir a continuidade do esqueleto, o suporte mecânico e uma eventual regeneração. As estratégias utilizadas rotineiramente para preencher esses defeitos ósseos incluem enxertos ósseos autógenos, implantes alográficos, metais e cerâmicas. Todas estas alternativas apresentam limitações específicas como a quantidade limitada de tecido obtido nos enxertos autógenos, a dificuldade em preparar os enxertos no formato desejado e o risco de transferência de patógenos quando da utilização de implantes sintéticos e alográficos (TURHANI et al., 2005).

O osso é responsável por diversas funções na manutenção dos sistemas corpóreos. Ele protege órgãos vitais, fornece suporte e sítio para inserção de músculos, gera células sanguíneas brancas e vermelhas para imunoproteção e oxigenação de outros tecidos e retém reservas de cálcio, fosfato e outros íons importantes. A diversidade de funções, combinada com seu potencial de remodelar em resposta a fatores ambientais locais tem tornado bastante difícil a reposição adequada de osso perdido apenas com a utilização de materiais sintéticos (TEMENOFF et al., 2000).

A medicina regenerativa com o uso de células-tronco é um campo que emerge rapidamente no tratamento de defeitos ósseos (KASTEN et al., 2008). Técnicas de engenharia tecidual surgem como alternativas para solucionar tais problemas e criar sistemas de enxertos ósseos viáveis. Seu princípio básico envolve o uso de um tipo apropriado de célula e de um arcabouço (matriz, carreador) biocompatível e bioabsorvível a fim de produzir um biosistema que mimetize funcional e estruturalmente determinado tipo de tecido (LI et al., 2005).

Para o reparo de defeitos ósseos, uma alternativa de engenharia tecidual seria combinar células com potencial osteogênico e um arcabouço adequado a fim de estimular a regeneração e o reparo ósseo (ARINZEH et al., 2005). Tais matrizes devem apresentar características bioquímicas, físico-químicas e geométricas específicas (LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005, MACHADO, 2007, MARTINS et al., 2008).

Matrizes tridimensionais para regeneração de tecido ósseo requerem além da microarquitetura interna, estruturas interconectadas altamente porosas a fim de permitir a migração e distribuição das células (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005). O design aberto e poroso destas matrizes aumenta a difusão e permite o crescimento vascular para dentro das estruturas implantadas (TURHANI et al., 2005).

Idealmente, arcabouços para engenharia tecidual deveriam agir como guia para direcionar o crescimento ósseo e a formação de matriz extra-celular em três dimensões. Porosidade apropriada, tamanho de poros e estrutura interconectada são necessárias para garantir a nutrição das células no interior do arcabouço, ao mesmo tempo em que fornecem espaço para a regeneração tecidual (TEMENOFF et al., 2000, GUO et al., 2009).

Inúmeros materiais têm sido utilizados em engenharia tecidual incluindo polímeros, biovidros e uma variedade grande de cerâmicas de fosfato de cálcio (CYSTER et al., 2005).

Recentemente, muita atenção tem sido dada ao uso do Cimento de Fosfato de Cálcio (CFC) como substituto ósseo. Este biomaterial apresenta composição e estrutura muito próxima da parte mineral do tecido ósseo e tem sido considerado um material bastante apropriado para a construção de arcabouços para engenharia de tecido ósseo (MACHADO, 2007; GUO et al., 2009). Além de apresentarem as características mencionadas, os CFCs destacam-se ainda pela facilidade de manipulação e moldagem (MORAES et al., 2004).

Existem diversos trabalhos publicados na área de biomateriais no Brasil, em especial sobre a obtenção e caracterização de hidroxiapatita na forma de pó. Entretanto, são poucos os trabalhos versando sobre CFCs, em especial o sistema α -fosfato tricálcico (α -TCP), e principalmente, não há trabalhos nacionais na obtenção de estruturas porosas desses materiais. Apesar disso, as tecnologias de processamento e de caracterização destes biomateriais são disponíveis no país, o que pode permitir a obtenção de materiais com custos relativamente baixos e de elevada qualidade. A partir deste conhecimento, Machado (2007) desenvolveu e caracterizou arcabouços de CFC para engenharia de tecido ósseo, macroporosos, utilizando como corpo gerador de poros, microesferas de parafina, que permitiram controlar a distribuição e o tamanho dos poros no biomaterial. Assim, o objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a viabilidade do CFC, de produção nacional, com

porosidade criada por meio de microesferas de parafina, como arcabouço para engenharia de tecido ósseo, analisando o comportamento de células-tronco mesenquimais cultivadas em meio indutor osteogênico sobre este biomaterial.



REVISTA DA LITERATURA

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

O reparo de defeitos ósseos extensos continua sendo um desafio para os cirurgiões bucomaxilofaciais. Diversos tipos de materiais podem ser utilizados nestes procedimentos: enxertos autógenos (obtidos do próprio paciente), enxertos alógenos (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie), enxertos xenógenos (obtidos de animais) ou implantes aloplásticos feitos de biomateriais, entretanto, cada material apresenta vantagens e limitações (CERRONI et al., 2002). A engenharia tecidual representa uma alternativa promissora para o preenchimento de defeitos ósseos extensos. O objetivo da engenharia tecidual é desenvolver um arcabouço com porosidade e resistência mecânica suficientes para permitir a migração, adesão, crescimento e proliferação das células resultando em uma boa integração com os tecidos circunjacentes (BURG; PORTER; KELLAN, 2000).

A expressão “engenharia tecidual” engloba uma variedade de abordagens com o mesmo objetivo e essas abordagens envolvem o uso de um ou mais dos seguintes elementos: matriz osteocondutiva, células osteoprogenitoras e fatores de crescimento osteoindutivos (BAKSH; DAVIES, 2000; BARRALET et al., 2002; MEYER et al., 2004). Geralmente associa-se o uso de células progenitoras ou diferenciadas cultivadas com fatores de crescimento específicos em um arcabouço de biomaterial (LI et al., 2005).

Uma das maneiras de se desenvolver estes bio sistemas seria isolando células viáveis do paciente, expandindo a população celular, cultivando as células sobre um arcabouço *in vitro* e posteriormente implantando o bio sistema desenvolvido novamente no paciente. Neste tipo de abordagem, o arcabouço deve ser bioabsorvível e atuar como uma matriz extra-celular artificial, servindo assim, temporariamente, como um guia para a adesão, proliferação e diferenciação celular. O arcabouço deve ainda apresentar uma rede macroporosa interconectada que permita a penetração de células e a transferência de nutrientes, oxigênio e outros produtos (KATHURIA et al., 2009).

Embora na maioria dos relatos, as células cultivadas sejam inoculadas no arcabouço de biomaterial poucas horas antes da implantação, uma técnica alternativa seria a de expandir as células pré-osteogênicas do estroma da medula óssea em cultura e, subseqüentemente, semeá-las e cultivá-las em um arcabouço de biomaterial por tempo suficiente para induzir a diferenciação osteogênica e a produção de matriz óssea extra-celular. A vantagem desta técnica é que as células iniciam a produzir matriz óssea *in vitro* e vão continuar este processo *in vivo*, resultando na aceleração da cicatrização óssea após a implantação, se comparado às células que são simplesmente semeadas sobre o arcabouço. Além disso, a matriz óssea produzida irá conter várias proteínas e fatores de crescimento que, somadas às células cultivadas, espera-se que induzam formação óssea após a implantação (de BRUIJN et al, 2000).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são particularmente atrativas para este tipo de aplicação devido à disponibilidade de técnicas de culturas já estabelecidas para isolar e expandir essas células *in vitro* a partir de doadores humanos adultos (MAUNEY et al., 2005).

Dentro do corpo, os tecidos são organizados em estruturas tridimensionais como órgãos funcionais ou sistemas de órgãos. Para construir tecidos e órgãos com êxito, o arcabouço deve ser projetado para facilitar a distribuição celular e guiar a regeneração dos tecidos em três dimensões (TEMENOFF et al., 2000; MACHADO, 2007). A presença de porosidade interna é uma das condições fundamentais para a estabilização e incorporação dos biomateriais pelos tecidos vivos, entretanto a quantidade de poros e fendas na estrutura do biomaterial pode acarretar uma diminuição na sua resistência (LEONEL et al., 2003).

A microestrutura de arcabouços tridimensionais, como o tamanho e o volume dos poros, apresenta alguns efeitos na secreção de matriz extra-celular e no crescimento das células. O tamanho dos poros do arcabouço desempenha um papel importante no recrutamento, migração e crescimento celular. Poros grandes permitem um suplemento efetivo de nutrientes, a difusão de gases e a remoção de restos metabólicos (KIM et al., 2005; LIEN; KO; HUANG, 2009), entretanto, Oh et al. (2007) demonstraram, com diferentes tipos de células (condrócitos, osteoblastos e fibroblastos) cultivados em arcabouços poliméricos, que diferentes células necessitam de diferentes tamanhos de poros para um crescimento mais efetivo.

Alguns requisitos básicos devem ser observados durante o desenvolvimento de arcabouços para engenharia tecidual. De acordo com MA (2004), um arcabouço tem que apresentar alta porosidade e tamanho de poro definido. Uma alta área superficial também é necessária. A biodegradabilidade é geralmente requerida, e uma taxa de degradação apropriada é necessária para igualar à taxa de formação do novo tecido formado. O arcabouço deve ainda possuir integridade mecânica para manter a estrutura pré-desenvolvida do tecido. Não deve ser tóxico para as células (ser biocompatível) e deve interagir positivamente com as células, incluindo melhorar a adesão celular, crescimento, migração e diferenciação de funções.

A maneira como as células se ligam ao arcabouço pode afetar seu comportamento: uma forte adesão e espalhamento celular está, usualmente, associada com proliferação, enquanto uma forma celular cuboidal, no caso de células osteogênicas, é freqüentemente exigida para o desempenho da função específica da célula. Além da morfologia, a relação espacial das células com sua matriz extra-celular pode ser importante para a continuação da diferenciação (TEMENOFF et al., 2000). Segundo Chou et al. (1995), a morfologia das células pode ser marcadamente influenciada pela topografia da superfície do substrato e esta morfologia apresenta estreita relação com o crescimento celular, a expressão de genes, o metabolismo da matriz extra-celular e a diferenciação celular.

Os fatores críticos que podem determinar o sucesso de um biosistema CTM/biomaterial para osteogênese incluem: adesão inicial das CTM, sobrevivência das células sobre o biomaterial, proliferação celular e a manutenção do processo de diferenciação celular (KASTEN et al., 2008). A qualidade da primeira fase de interações entre célula/biomaterial, que inclui o recrutamento, a adesão e o espalhamento celular, irá influenciar a capacidade das células de proliferar e diferenciar em contato com o implante (ANSELME, 2000). Estudos prévios descrevem que a porosidade do biomaterial apresenta um importante papel no sucesso destes biosistemas (KASTEN et al., 2008).

Diversos tipos de materiais têm sido utilizados em engenharia tecidual, destacando-se os materiais cerâmicos e poliméricos. A investigação de novos materiais que possam ser utilizados como arcabouços, representa uma área essencial para o desenho das estratégias de engenharia de tecidos. Neste contexto situam-se os cimentos de fosfato de cálcio (CFCs), cuja principal vantagem é a facilidade de uso, permitindo a obtenção de formatos complexos (MACHADO, 2007).

De acordo com Rossa Jr et al. (2005) os implantes baseados em fosfato de cálcio encontram-se entre os materiais mais promissores para engenharia de tecido ósseo, uma vez que apresentam grande similaridade com a fase mineral do osso. A busca por melhores resultados tem levado a modificações no processo de sinterização através do qual estes materiais são obtidos. Essas modificações podem resultar em vários tipos de materiais de fosfato de cálcio, com variações na degradabilidade e na porosidade, que podem afetar tanto a biocompatibilidade quanto a resistência mecânica dos mesmos. Uma destas variações é o cimento de fosfato de cálcio.

Recentemente, muita atenção tem sido dada ao uso do CFC como substituto ósseo em ortopedia, otorrinolaringologia, neurocirurgia, cirurgia plástica e reconstrutiva, já que estes preenchem a maioria dos requisitos para o biomaterial ideal. Desde sua descrição, em 1983, e em decorrência de sua potencial utilidade em aplicações biomédicas, estes cimentos têm sido constantemente avaliados e aprimorados (CIPRANDI, 2007).

2.2 CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), componente majoritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos (MACHADO, 2007). Sinteticamente, duas formas de HA podem ser produzidas: cerâmica e não-cerâmica. Os primeiros implantes de HA eram sinterizados, um processo que causava a fusão dos cristais através de seu aquecimento a temperaturas elevadas. A HA sinterizada é uma cerâmica essencialmente não-reabsorvível. Os materiais não-cerâmicos, dentre os quais encontram-se os cimentos de fosfato de cálcio, são produzidos pela cristalização direta da HA. Nenhum aquecimento é necessário para formar um implante estruturalmente estável e a falta de fusão dos materiais não-cerâmicos parece permitir a reabsorção dos mesmos com o passar do tempo (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999).

Genericamente, os CFCs são materiais constituídos por um pó (sal de fosfato de cálcio) e um líquido (água ou solução aquosa), os quais, ao serem misturados

formam uma pasta que endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio, ocorrendo a cura pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado (DRIESSENS et al., 1997, CARRODEGUAS et al., 1999; YUAHN et al., 2000).

Desde que surgiram no mercado, no início dos anos 80, as cerâmicas de fosfato de cálcio foram consideradas os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos em decorrência de certas vantagens por elas apresentadas. Essa preferência deve-se principalmente às suas inigualáveis propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, o que significa que, ao serem implantadas no sítio ósseo, não induzem resposta imunológica; são capazes de ligar-se diretamente ao tecido ósseo e permitem o crescimento do osso ao longo de sua superfície (LIU et al., 1997; CARRODEGUAS et al., 1999).

Os CFCs comportam-se *in vivo* de maneira semelhante às biocerâmicas de fosfato de cálcio, não atuando como substitutos ósseos permanentes, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo neoformado, comportamento este denominado osteotransdutividade (CIPRANDI, 2007). Como vantagem em relação as biocerâmicas de fosfato de cálcio, eles não necessitam de formas pré-fabricadas ou granulares, sendo utilizados na forma de pasta auto-curável (SANTOS, 2005).

A similaridade química e morfológica entre este biomaterial e a parte mineral do tecido ósseo permite a osteocondução, sendo o cimento substituído por osso novo com o passar do tempo e com a vantagem de não desencadear processos inflamatórios e de corpo estranho, com eventual expulsão do material implantado (MACHADO, 2007).

Santos (2002) desenvolveu um CFC baseado no alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) com adição de um defloculante, com resistência à compressão superior aos tradicionais, minimizando, com isto, a principal desvantagem dos CFCs conhecidos que é a baixa resistência mecânica. Avaliações biológicas comprovaram sua biocompatibilidade, ampliando suas possíveis indicações em locais solicitados por carga, encontrando aplicações odontológicas como substituto ósseo no reparo de defeitos amplos, preenchimento de alvéolos e consolidação de fraturas múltiplas. Machado (2007) ressalta que a fase α -TCP é a mais desejável para a confecção de arcabouços para engenharia de tecido ósseo, já que existe uma diferença entre a solubilidade da fase α -TCP e da fase β -TCP. A fase α -TCP é bastante solúvel no

organismo vivo enquanto a fase β -TCP possui um tempo de degradação maior devido à sua maior estabilidade química.

Dentre as características que tornam os cimentos de fosfato de cálcio biomateriais atrativos para a reconstituição ou remodelação óssea encontram-se ainda a facilidade de manipulação e moldagem (SANTOS et al., 2005). Genericamente, os cimentos de fosfato de cálcio são reabsorvidos devido à atividade osteoclástica, formando, ao mesmo tempo, novo tecido ósseo na interface osso-implante. Desta forma, os CFCs não atuam como substitutos permanentes do osso, apenas temporários, sendo lentamente substituídos por tecido ósseo de nova formação (MORAES et al., 2004).

Como a estrutura macroporosa não resiste a tensões mecânicas severas sem uma estabilização cirúrgica, a maior parte das aplicações dos materiais de fosfato de cálcio consiste no preenchimento de defeitos ósseos onde estão presentes uma estabilidade mecânica primária e um contato com o osso receptor. A macroporosidade contribui para a osteocondução, mas também apresenta vários efeitos sobre o comportamento mecânico destes materiais. A colonização celular e a formação óssea aparentemente ocorrem quando o tamanho dos poros é superior a 100 μm (GAUTHIER et al., 1998; CHANG et al., 2000) e uma redução nesta macroporosidade pode apresentar resultados negativos para as propriedades biológicas dos mesmos.

Ainda não há consenso na literatura sobre o grau de porosidade e o tamanho de poros que mais favorecem a adesão, proliferação e diferenciação de CTM *in vitro* e *in vivo* (CHANG et al., 2000; CHOUTEAU et al. 2003; KASTEN et al., 2008).

Chouteau et al. (2003) analisaram o comportamento *in vitro* de fibroblastos e osteoblastos cultivados sobre cerâmicas de fosfato de cálcio e concluíram que um tamanho de poro de 300 μm ou mais é o indicado para a invasão do biomaterial pelas células.

Kasten et al. (2008) examinaram a influência da porosidade de três cerâmicas de fosfato β -tricálcico sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. Para isso, arcabouços de TCP cobertos com células-tronco mesenquimais foram mantidos em meio de cultura indutor por 21 dias. A medição das proteínas totais, bem como a atividade da fosfatase alcalina foram utilizados como indicadores de crescimento e produção de matriz e de diferenciação osteogênica. Os resultados demonstraram que a porosidade e o tamanho dos poros

influenciaram não apenas na produção de proteínas, mas também na atividade da fosfatase alcalina, que é um importante marcador de diferenciação osteogênica.

Boyan et al. (1996) relataram que poros com diâmetro variando entre 200 e 400µm são os que mais favorecem a migração, adesão e proliferação de osteoblastos. Segundo o autor, isso pode ser justificado pela curvatura do poro que fornece compressão e tensão ideais sobre os receptores mecânicos das células e permite que elas migrem em direção a poros deste tamanho.

Até o momento são consagradas no mercado três marcas de CFC comerciais: NORIAN® *Skeletal Repair System* (Norian Corp., Cupertino CA, USA), CEMENTEK® (Teknimed S.A., Vignacourt, França) e BIOCEMENT® D (Merck Biomaterial, Darmstadt, Alemanha). Em estudos comparativos de algumas propriedades destes cimentos observa-se que, o BIOCEMENT D® tem propriedades superiores, seguido do NORIAN® SRS e pelo CEMENTEK®, nessa ordem (DRIESSENS et al., 1997).

A escolha da técnica de fabricação apropriada para o arcabouço é crítica, pois pode influenciar significativamente as propriedades dos implantes e suas características de degradação. Há uma necessidade crescente de se procurar novos materiais e metodologias para produção de arcabouços para engenharia de tecido ósseo (MARTINS et al., 2008).

Já que um dos pré-requisitos exigidos de arcabouços para engenharia de tecido ósseo é que tenham uma estrutura macroporosa, é necessário que seja possível criar essa macroporosidade no material. Inúmeros processos são atualmente utilizados para produzir cerâmicas porosas. As técnicas mais simples se baseiam na incorporação de uma segunda fase orgânica na composição do material cerâmico, em proporções e tamanho controlados, que após sua eliminação deixam vazios de mesmo tamanho (MACHADO, 2007). A utilização de microesferas de parafina já havia sido relatada em arcabouços poliméricos (MA, 2004). Machado (2007), visando obter suportes tridimensionais para engenharia de tecido ósseo, com poros esféricos interconectados bem controlados, adaptou a técnica das microesferas de parafina para a confecção de arcabouços de cimento de fosfato de cálcio.

2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Um dos aspectos mais importantes da engenharia de tecido ósseo é a introdução de células bioativas em um arcabouço tridimensional macroporoso. As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam inúmeras vantagens sobre outros tipos celulares, e têm sido largamente utilizadas na engenharia de tecido ósseo. Estas células estão presentes em diversos tecidos humanos e podem ser retiradas diretamente da medula óssea. Elas são capazes de originar vários tecidos como osso, cartilagem, músculo e outros tecidos de origem mesenquimal. Além disso, apresentam como vantagem o fato de não serem rejeitadas pelo sistema imune (GUO et al., 2009).

O estroma da medula óssea consiste de uma população celular heterogênea que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoéticas. Adicionalmente, esse estroma contém células com características de células-tronco, que possuem potencial para se diferenciar em outras que irão formar os progenitores hematopoéticos e mesenquimais, além de constituírem um suporte hematopoético para os tecidos (KRESSBACH et al., 1999). Vários pesquisadores têm relatado que as células da medula óssea, quando cultivadas em condições apropriadas, conseguem manter sua viabilidade e são capazes de se diferenciar em células osteogênicas (de BRUIJN et al., 2000).

Osteoblastos, adipócitos, condrócitos e miócitos são células derivadas de uma progenitora comum, denominada célula mesenquimal indiferenciada ou célula-tronco mesenquimal. Durante o processo de sua diferenciação, as células progenitoras adquirem fenótipos específicos, sob o controle de fatores reguladores. As proteínas morfogênicas ósseas (BMP's) são fatores de crescimento que desempenham um papel crítico na proliferação e na diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002). Dentre as inúmeras BMP's já descritas, a BMP-4 está envolvida nos estágios iniciais da osteogênese (SHIMIZU; YOSHIKAWA ; TAKAOKA, 1995; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; LORO, 2002).

Muitos tecidos adultos contêm populações de células-tronco que têm a capacidade de se renovar após um trauma ou uma doença. A medula óssea adulta contém células-tronco que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais

como osso, cartilagem, músculo, tendão, tecido adiposo e estroma (PITTINGER et al., 1999).

Long (2001) definiu a osteogênese através da compartimentalização categórica das fases de diferenciação, o que chamou de hierarquia da população de células ósseas. A hierarquia de células precursoras ósseas é melhor entendida se o desenvolvimento da célula precursora for dividido artificialmente em um número de estágios de desenvolvimento: células-tronco mesenquimais, células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos (FIGURA 1). Assim, uma compartimentalização serve para categorizar e descrever características das subpopulações de todas as linhagens em desenvolvimento, mas é importante ressaltar que estas células existem, de fato, como um desenvolvimento contínuo, não tendo limites distintos entre si e, conseqüentemente, sem compartimentalização (MALAVAL et al., 1999).

- Células-tronco mesenquimais – classicamente definidas como células que têm o potencial de produzir clonalmente múltiplas linhagens celulares e têm a capacidade de se auto-renovar
- Células osteoprogenitoras – são funcionalmente definidas como sendo aptas a gerar, clonalmente, as células de uma ou mais linhagens, mas sem capacidade de auto-renovação.
- Pré-osteoblasto – Representa um estado de transição entre o progenitor altamente proliferativo e o osteoblasto maduro.
- Osteoblastos – Células de aspecto cuboidal, sintetizadoras de matriz osteóide.

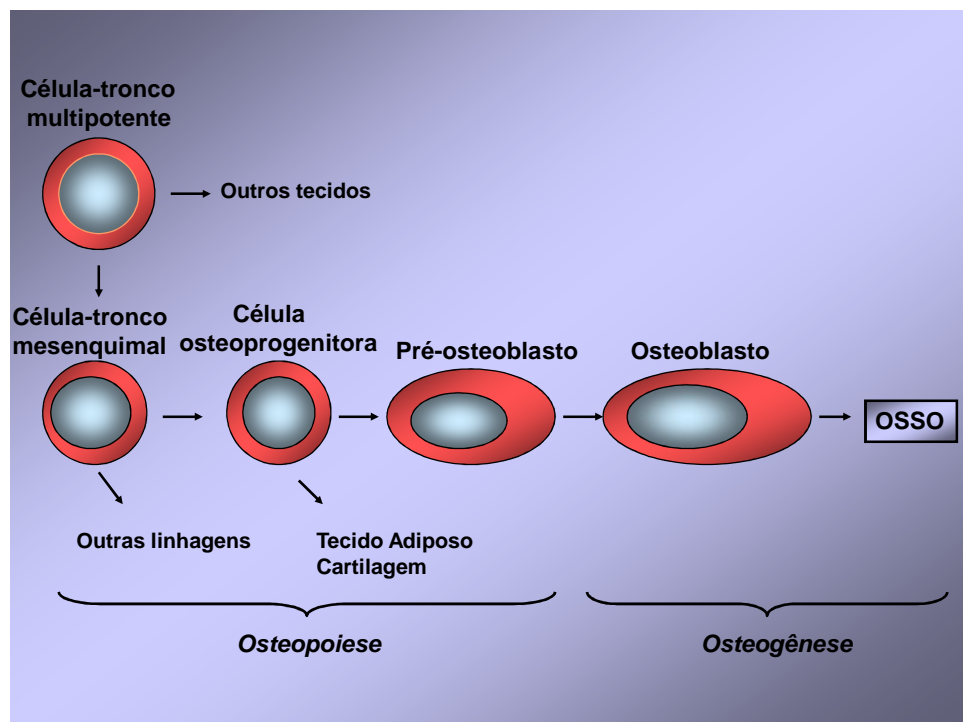


Figura 1: Desenvolvimento da célula óssea
 Fonte: Long (2001).

Em cada estágio de diferenciação, a célula expressa determinados tipos de proteínas. Experimentos têm revelado papéis específicos bastante significativos para proteínas individuais ou famílias de proteínas. A osteopontina é largamente distribuída em diferentes tecidos, enquanto a osteocalcina é altamente expressa no osso e nas cartilagens esqueléticas. No osso, a osteocalcina é expressa por células osteoblásticas maduras, responsáveis pela deposição de matriz mineralizada, mas apenas durante as fases iniciais da formação do novo osso (RIMINUCCI; BIANCO, 2003).

A osteocalcina é a maior proteína não-colágena do osso e é expressa em abundância por osteoblastos maduros. Dos marcadores osteoblásticos, a osteocalcina é, atualmente, considerada a mais específica e como sendo o marcador que se expressa mais tardiamente, indetectável em pré-osteoblastos e abundantemente expressa em osteoblastos pós-mitóticos e maduros. É constituída por 49 aminoácidos, sendo três destes GLA (ácido gama-carboxiglutâmico). Já as análises da osteopontina mostram que esta proteína já é detectável em células precursoras em estágios relativamente precoces da diferenciação (OZAWA; KASUGAI, 1996; AUBIN, 1998).

A atividade da fosfatase alcalina é outro marcador bastante comum de

diferenciação osteoblástica (REILLY et al., 2007). A fosfatase alcalina é uma enzima que está localizada na membrana celular de células osteoblásticas e condroblásticas (AKAHANE et al., 1999) e caracteriza-se por ser um dos marcadores mais precoces de pré-osteoblastos, o que a torna um valioso indicador de diferenciação osteoblástica (MUELLER; GLOWACKI, 2000).

2.4 PCR E PCR EM TEMPO REAL

A técnica de PCR, desenvolvida, nos anos 80 do século XX, por Kary Mullis, tem como objetivo produzir uma quantidade apreciável de um segmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). O DNA molde sofre uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. A técnica de PCR consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região de ácido nucléico com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores.

Três eventos distintos ocorrem durante a reação de PCR, a cada ciclo: desnaturação do DNA molde (a 95°C), ligação (*annealing*) dos oligonucleotídeos iniciadores (a 64°C) e polimerização do DNA (a 72°C). A primeira fase é a desnaturação da fita de DNA que acontece quando a reação é aquecida. Esta separação é essencial para que, na segunda fase, dois oligonucleotídeos iniciadores se liguem às sequências das bases complementares da cadeia molde. Estes oligonucleotídeos iniciadores são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar e servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termoestável (Taq), tendo sido isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos de PCR têm lugar a temperaturas situadas entre os 64° e os 95°C. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Normalmente, são repetidos cerca de 30 ciclos, o que demora apenas algumas horas.

Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada

ciclo de PCR, logo, dá-se um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos 2^n vezes mais cópias do que no início.

O segredo do sucesso da técnica de PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que especificidade da PCR é dada pelos oligonucleotídeos iniciadores. É uma técnica rápida, barata e segura.

Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos. Outras desvantagens são a relativa facilidade com que ocorre contaminação da amostra por DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível) e a limitada extensão da sequência que é possível amplificar. Pode também ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação.

O primeiro relato da técnica de QT-PCR foi feita por Higushi, em 1993. A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real revolucionou o processo de quantificação dos fragmentos, pois identifica o DNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação de fluorescência. Esta técnica apresenta também maior especificidade devido à utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. A amplificação e a detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e a fotodocumentação. Com a eliminação destas etapas, os resultados são obtidos mais precocemente pela PCR em tempo real, quando comparada a convencional.

Com o QT-PCR é possível mensurar o número de ciclos necessários para se detectar um sinal, denominado Cycle Threshold (C_T) e usá-lo para determinar o nível inicial de um mRNA específico presente na preparação (DEPREZ et al., 2002). Portanto, o C_T é o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial. Este ponto permite a quantificação exata fundamentada na fluorescência. A emissão da luz pelos compostos fluorescentes (moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específico) gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Com isso, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a

quantidade do produto amplificado. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR Green[®] e TaqMan[®]. O SYBR Green[®] se liga entre a dupla fita do DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma luz verde. No entanto, a ligação da fita de DNA não é específica, podendo se ligar a dímeros dos oligonucleotídeos iniciadores e outros produtos inespecíficos, alterando, com isto, a concentração do fragmento alvo. No início da amplificação, a reação contém DNA desnaturado, oligonucleotídeos iniciadores e o SYBR Green[®]. As moléculas não ligadas ao SYBR Green[®] apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo (ruído), o qual é subtraído durante a análise instrumental. Após o reconhecimento dos oligonucleotídeos iniciadores, ocorre a polimerização do DNA (mediada pela enzima Taq polimerase) e os compostos fluorescentes (SYBR Green[®]) se ligam ao DNA polimerizado, sendo que a reação é monitorada continuamente, e o aumento de fluorescência é observado em tempo real. No ciclo da desnaturação do DNA, as moléculas de SYBR Green[®] são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (BOXER, 2000, BUSTIN; MUELLER, 2005).



OBJETIVOS

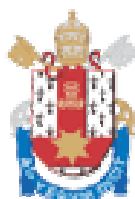
3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a viabilidade do cimento de fosfato de cálcio, de produção nacional, com macroporosidade criada através de esferas de parafina, como matriz carreadora para células osteogênicas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o arcabouço de CFC macroporoso por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Analisar, por meio de MEV, o comportamento e a morfologia das células aderidas ao arcabouço de CFC nos diferentes períodos de cultura.
- Detectar, através do QT-PCR, a expressão dos genes *BGLA* e *SSP1* que codificam as proteínas osteocalcina e osteopontina respectivamente, bem como a atividade da fosfatase alcalina, nos diferentes períodos de cultura.



4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS BIOÉTICOS

Esta pesquisa foi realizada após a aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - protocolo nº 0064/05 (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS – protocolo nº 05/02882 CEP (ANEXO B).

4.2 CONFECÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Foram confeccionados, no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia Mecânica da UFRGS, 15 arcabouços de cimento de fosfato tricálcico com 15mm de diâmetro (FIGURA 2.A) e aproximadamente 3mm de altura (FIGURA 2.B). Como corpo gerador de poros foram utilizadas microesferas de parafina (MACHADO, 2007), que conferiram aos arcabouços uma estrutura macroporosa e interconectada. Considerando que, segundo a literatura (GAUTHIER et al., 1998; CHANG et al., 2000), o tamanho de poro ideal para o crescimento de tecido ósseo é acima de 100µm, a faixa granulométrica adotada foi a de 100 a 250µm.

As amostras utilizadas neste estudo foram desenvolvidas e caracterizadas por Machado (2007). O cimento de α - fosfato tricálcico foi sintetizado em laboratório utilizando-se a metodologia reportada por Driessens (1997). Foi adicionado um defloculante à pasta cimentícia que provocou uma maior compactação da estrutura e uma maior resistência mecânica (SANTOS, 2002). A resistência mecânica dos corpos da solução com defloculante tendeu a uma estabilização a certo valor (~3,60MPa).

Os arcabouços foram confeccionados homogeneizando-se as esferas de parafina juntamente com o α -TCP e só então adicionado à fase líquida. A fase líquida sempre foi adicionada na proporção de 1ml para cada 1g de α -TCP. A pasta formada foi vazada em moldes de silicone e os corpos-de-prova foram desmoldados

após as 24h de cura e então submetidos a um tratamento térmico para extração da parafina. O tratamento térmico consistia em colocar os corpos-de-prova em estufa a 100°C sobre papéis absorventes para extração da maior parte da parafina e, posteriormente a colocação dos mesmos em um forno tipo mufla a uma temperatura de 600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, com um patamar de 1h.

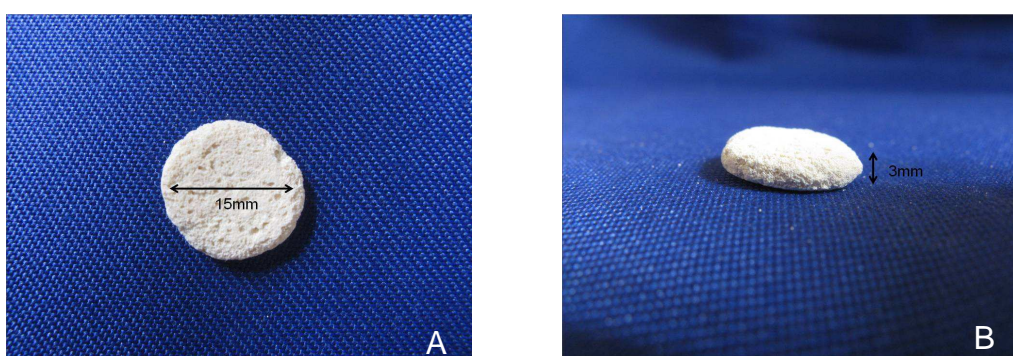


Figura 2: Discos de Cimento Ósseo de Fosfato de Cálcio. A) Vista superior: diâmetro igual a 15 mm. B) Vista lateral: altura aproximada de 3 mm.

As esferas de parafina (FIGURA 3) foram confeccionadas com o intuito de obter corpos orgânicos que poderiam, após queima a uma determinada temperatura, proporcionar a formação de poros de formato, tamanho e distribuição controlados. A parafina foi escolhida por ser um material orgânico de baixo ponto de fusão, o que possibilita uma facilidade no processamento; por ter inércia química, fazendo com que não haja nenhuma reação com o cimento ou a fase líquida; e por ser de baixo custo. Para a obtenção de parafina na forma de microesferas utilizou-se um béquer com capacidade para 1l contendo 500ml de água deionizada, 4g de poli (álcool vinílico) (PVA) (Kuraray Poval) e 5g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) (Synth). Esta solução foi aquecida à 100°C e nela foi adicionada a parafina comercial (Petrobrás) e aguardada sua total fusão. Colocou-se o sistema sob agitação mecânica de 400 rpm durante aproximadamente 10 min para a formação de uma espuma consistente, e então foi desligado o aquecimento e feito um resfriamento rápido com a adição de água fria (aproximadamente 5°C). As esferas foram separadas da solução através de uma peneira com faixa granulométrica entre 100 e 250µm. As esferas foram

lavadas com água deionizada, secas à temperatura ambiente e armazenadas em um dessecador.

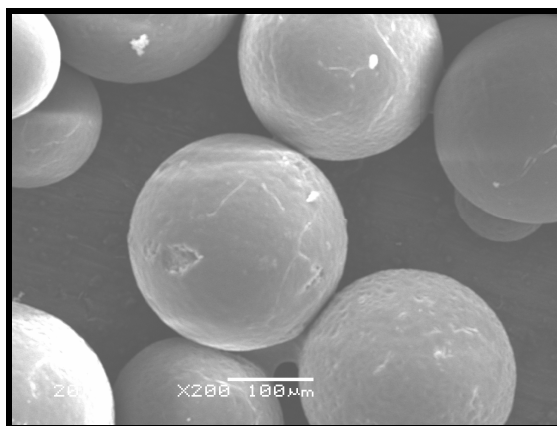


Figura 3 : Fotomicrografia de MEV mostrando as esferas de parafina utilizadas na confecção de poros no cimento. Fonte: Machado, (2007).

A caracterização das amostras foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura, através da qual foram aferidos a morfologia, a distribuição e o tamanho dos poros nos arcaçouços.

A temperatura para a extração da parafina do cimento foi determinada em 600°C, não ocorrendo mudanças significativas nas fa ses do cimento. As medidas de pH foram realizadas com um medidor de pH digital marca comercial DIGIMED[®], modelo DM-20, a temperatura de 22°C ± 1°C. Houve uma queda significativa no valor do pH logo nos primeiros dias de imersão, voltando a subir com o aumento no número de dias até a estabilização em um valor próximo a 7,3 quando o sistema entra em equilíbrio. Um cimento, para ser utilizado como substituto ósseo, requer um rígido controle do pH, pois sua variação pode desencadear uma série de problemas ao local de enxerto, e ao corpo humano como um todo.

Em testes preliminares, o arcaçouço de CFC foi incubado em meio de cultura, sem a presença de células. Nenhuma modificação da estrutura macroscópica foi observada após cinco dias e o pH do meio manteve-se neutro.

4.3 DISPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS

Após serem autoclavados a 121°C por 15min (OZAWA; KASUGAI, 1996; SILVA JÚNIOR, 2003), os arcabouços foram dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Nunclon™ Delta Surface, Nunc Products; Denmark), sendo uma placa para cada período de cultura, definidos em cinco, dez e 15 dias (FIGURA 4).

Cada placa recebeu cinco discos, sendo quatro deles utilizados para realização do QT-PCR (para avaliação da expressão dos genes que codificam as proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Fosfatase Alcalina) e um para avaliação por meio de MEV, do comportamento e morfologia das células aderidas ao CFC. Também foram conduzidos controles onde as células foram cultivadas em poços sem a presença dos arcabouços, para melhor visualização da viabilidade celular.



Figura 4: Colocação dos arcabouços de CFC na placa de poliestireno de 24 poços.

As amostras avaliadas por MEV foram preparadas conforme as instruções do Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS.

4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA

Células provenientes de medula e fragmentos ósseos foram obtidas, após consentimento por meio de Termo de Consentimento Informado (ANEXO C), de um paciente de 45 anos de idade, com bom estado geral, admitido no Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital Independência da ULBRA, para cirurgia de reconstrução de maxila atrésica, com enxerto ósseo autógeno removido da crista do osso íliaco (FIGURA 5).

Depois de iniciada a cirurgia, a medula e o trabeculado ósseo foram aspirados da crista íliaca do paciente com uma seringa de 20ml, ao mesmo tempo em que se realizava a curetagem da região, a fim de conseguir maior intimidade tecidual e maior quantidade de medula óssea e osso esponjoso. O material obtido foi colocado em uma nova seringa de 20ml e, após pressão sobre o êmbolo, o material resultante foi depositado em um tubo estéril e armazenado em banho de gelo até a separação em gradiente de densidade (FIGURA 5.D). Os procedimentos laboratoriais foram todos realizados no Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias do Instituto de Pesquisas Biomédicas no Hospital São Lucas da PUCRS.

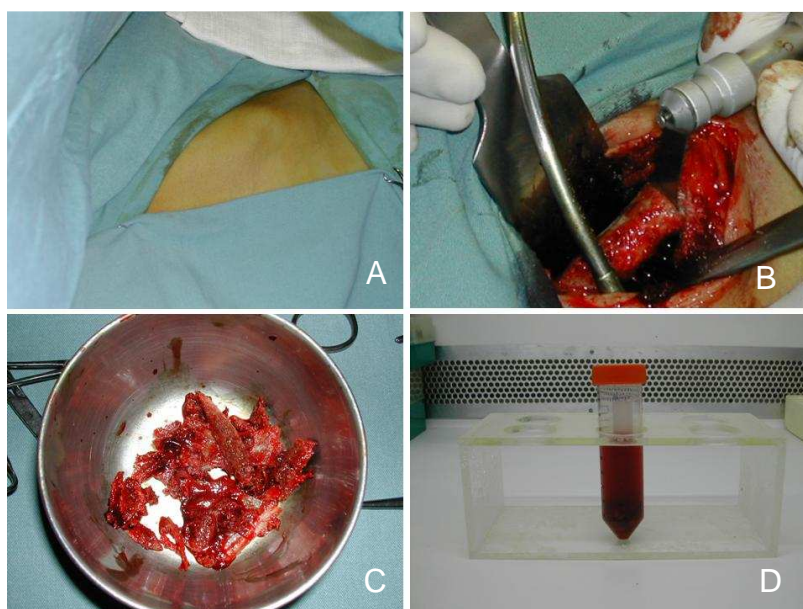


Figura 5: Remoção de medula óssea humana da crista do osso íliaco; A. Preparação do campo operatório. B. Acesso e osteotomia da crista do íliaco; C. Medula e fragmentos ósseos da região doadora após curetagem, raspagem e aspiração da área; D) Células da medula óssea armazenadas em tubo estéril para utilização nos procedimentos laboratoriais.

As células de medula óssea obtidas foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Histopaque[®] - 1077 (Sigma Diagnostics, USA). A camada de células mononucleares foi removida e lavada com 10ml de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Invitrogen, USA) e centrifugada a 1500rpm por 3 min.

As células de medula óssea purificadas foram então suspensas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 50µg/ml de gentamicina (Gibco, USA) e contadas. Um novo meio de cultura foi adicionado para o ajuste da concentração celular contendo 40ng de BMP-4 por ml de DMEM.

A suspensão foi adicionada sobre as placas de 24 poços previamente preparadas, contendo os discos de CFC no seu interior. Cada poço contendo um disco de CFC recebeu 1ml de DMEM contendo $0,5 \times 10^5$ células e 40ng/µl de BMP₄. Finalmente as culturas foram incubadas e mantidas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂. Foram realizadas trocas do meio de cultura a cada três dias.

4.5 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *BGLA*, *SSP1* E FOSFATASE ALCALINA

A técnica de PCR em tempo real utilizada neste estudo baseou-se na amplificação do cDNA com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene e detecção por um feixe de laser capaz de capturar a fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green[®] a cada síntese. Este processo permitiu quantificar os níveis das sequências complementares ao mRNA para esses genes presentes nas amostras analisadas.

4.5.1 Obtenção do RNA total das amostras

O RNA total das células foi isolado, empregando-se uma solução de TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA). As células aderidas à superfície do CFC foram lavadas

uma vez com 1 ml de DPBS. Depois, foram adicionados 200 μ l de DPBS e 800 μ l de TRIZOL e as células foram incubadas à temperatura ambiente para destruição das membranas celular e nuclear e liberação dos ácidos nucléicos.

Após 5 minutos, as suspensões foram removidas da placa de cultura e transferidas para um tubo Eppendorf seguida da adição de 160 μ l de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas por 10 min à temperatura ambiente e centrifugadas (Eppendorf 5417R, USA) a 14.000 rpm a 4°C por 15 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 400 μ l de álcool isopropílico gelado. Na seqüência, as amostras foram incubadas por duas horas, a -20°C e, posteriormente, centrifugadas por 10 min, nas mesmas condições descritas anteriormente. Os precipitados foram lavados com 500 μ l de etanol à 75% gelado, e centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente durante, aproximadamente, 30 min, para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20 μ l de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1%, Invitrogen, USA), contendo 1 μ l de inibidor de Rnase (40 U/ μ l; Invitrogen, USA). As amostras foram tratadas com 10U de Desoxirribonuclease I (DNase I 124U/ μ l, Invitrogen, USA), em volume final de 22 μ l e incubadas durante 15 min à temperatura ambiente. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 μ l de 25mM de EDTA e as amostras foram incubadas a 65°C por 10 min.

4.5.2 Transcrição Reversa para Obtenção dos cDNA's

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, procedeu-se uma transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), que foi realizada utilizando-se a enzima Superscript II e os iniciadores oligo-dT₂₋₁₈ (Invitrogen, USA). Cada reação consistia de 22 μ l da extração de RNA total, 0,5 μ l da enzima Superscript II (200U/ μ l; Invitrogen, USA), 0,2 de oligo-dT₁₂₋₁₈, 4,5 μ l de DTT (0,1M; invitrogen, USA), 4,5 μ l de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 μ l de MgCl₂ (50 mM), 9 μ l de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA) e H₂O-MQ até completar 45 μ l de solução de reação. As reações foram então levadas a um

termociclador (Peltier Thermocycler, MJ Research, USA) e submetidas aos seguintes ciclos: 10 min a 25°C, 45 min a 42°C, e 3 min a 99° C. Após o término da transcrição reversa foram adicionadas 5U de ribonuclease H (Invitrogen, USA) e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 min. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso para a reação da PCR.

4.5.3 Técnica da PCR em Tempo Real (QT-PCR)

A expressão dos transcritos de RNA (mRNA) para as proteínas da linhagem osteogênica, osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina foi determinada pela técnica da PCR em tempo real usando o termociclador iCYCLER (Bio-Rad) (FIGURA 6) . Cada amostra foi analisada em duplicatas biológicas.



Figura 6: Aparelho iCYCLER (BIO-RAD) para amplificação do cDNA do QT-PCR.

Os resultados foram analisados usando o sistema de detecção de sequência (SDS), *software* (Applied Biosystems). Para cada período estudado foram avaliados os diferentes valores de C_T do limiar do ciclo relativo da expressão de cada gene *BGLA*, *SSP1* e *ALP*.

A abundância relativa dos transcritos foi determinada pela comparação dos valores de C_T definido como o ciclo na qual há um aumento significativo na magnitude do primeiro sinal gerado pela reação de PCR. Foi empregado o método de quantificação relativa utilizando-se o gene da β -actina como controle. Desta

forma, os níveis de expressão relativa de cada gene foram normalizados com a expressão do gene da β -actina na relação ($C_{T(OP/OC/ALP)}/C_{T(\beta-actina)}$).

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após cada período de cultura, os discos foram avaliados através de MEV, a fim de analisar o comportamento das células em contato com a superfície do biomaterial. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um equipamento marca PHILIPS®, modelo XL30. As amostras analisadas sofreram a aplicação de uma camada fina de ouro via *sputtering*.

Para realização da MEV as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído de 2% por 12hs. Na sequência as amostras foram lavadas em várias trocas com solução tampão. Posteriormente as amostras foram desidratadas em acetona, em concentrações que variaram entre 50 e 100%, sendo que as amostras permaneceram cerca de 20 min em cada concentração. As peças foram então transferidas para o aparelho de ponto crítico e após secagem foram montadas sobre os stubs. Foi realizada metalização das amostras com ouro.



RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os discos foram avaliados, quanto a sua topografia, por meio de MEV.

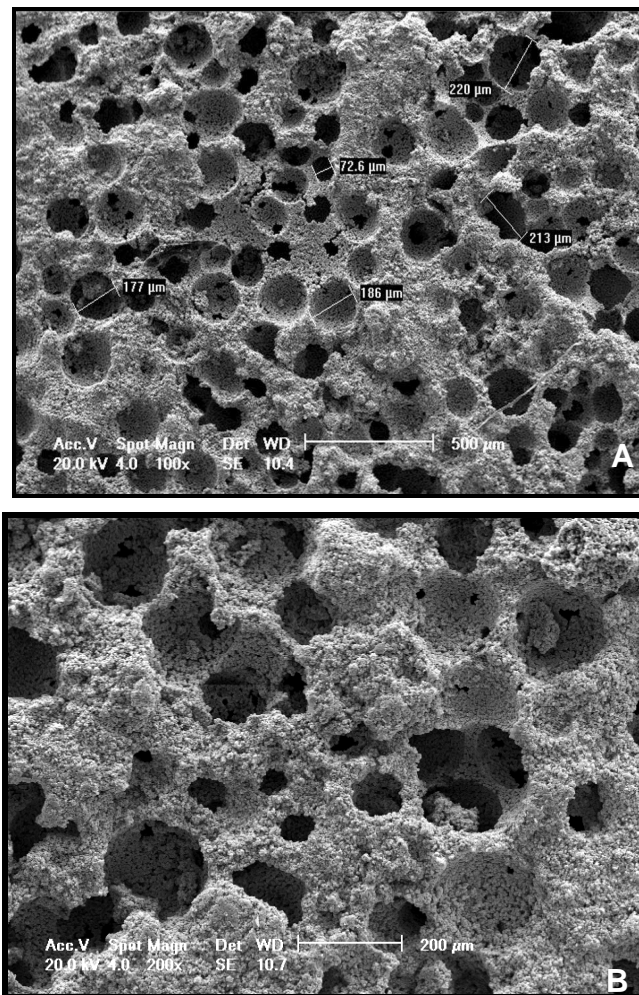


Figura 7: Fotomicrografias eletrônicas da superfície macroporosa de CFC. Em A) Magnificação de 100x. Em B) Magnificação de 200x.

É possível perceber, através das imagens de MEV, a forma esférica dos poros e a interconectividade dos mesmos (FIGURA 7). Não foram encontrados dados na literatura que demonstrem a quantidade de esferas de parafina necessárias para obter-se interconectividade. A quantidade de esferas adicionadas

está ligada à formação de uma camada mínima de cimento entre as esferas, de forma que elas possam entrar em contato umas com as outras e, assim, após retirada da parafina, serem formadas interconexões entre os poros oriundos das esferas de parafina. O tamanho dos poros encontrados coincide com o tamanho das microesferas de parafina utilizadas, que oscilou entre 100 e 250 μm .

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As imagens de MEV foram úteis para o entendimento do modo como as células se desenvolvem em contato com o biomaterial.

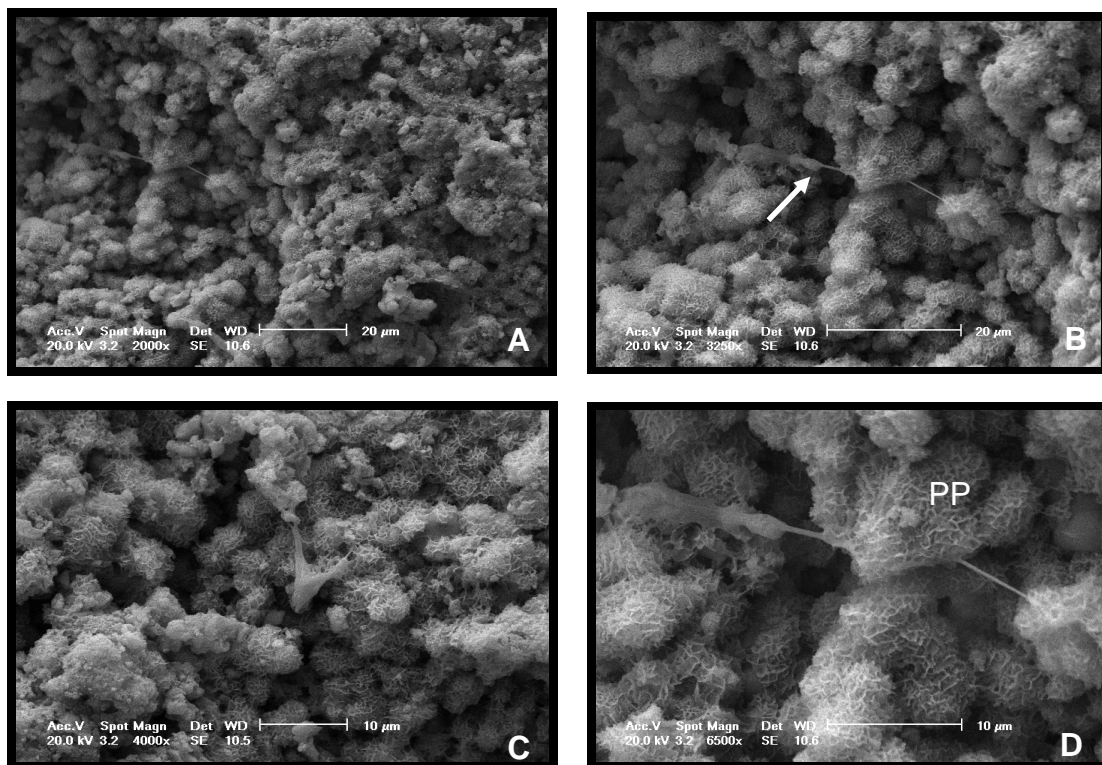


Figura 8: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC no 5º dia de cultura. A) Magnificação de 2000x, B) Magnificação de 3250x. Seta: célula de aspecto alongado e fusiforme. C) Magnificação de 4000X. D) Magnificação de 6500x. PP – placas petalóides.

No 5º dia de cultura, observa-se um pequeno número de células com aspecto alongado e fusiforme (FIGURA 8).

Na Figura 8.D, observa-se a presença de glóbulos ou placas petalóides (PP), que são característicos dos cimentos de fosfato de cálcio baseados no α -TCP. É pelo inter cruzamento destes cristais que ocorre o aumento da resistência mecânica do material (MACHADO, 2007).

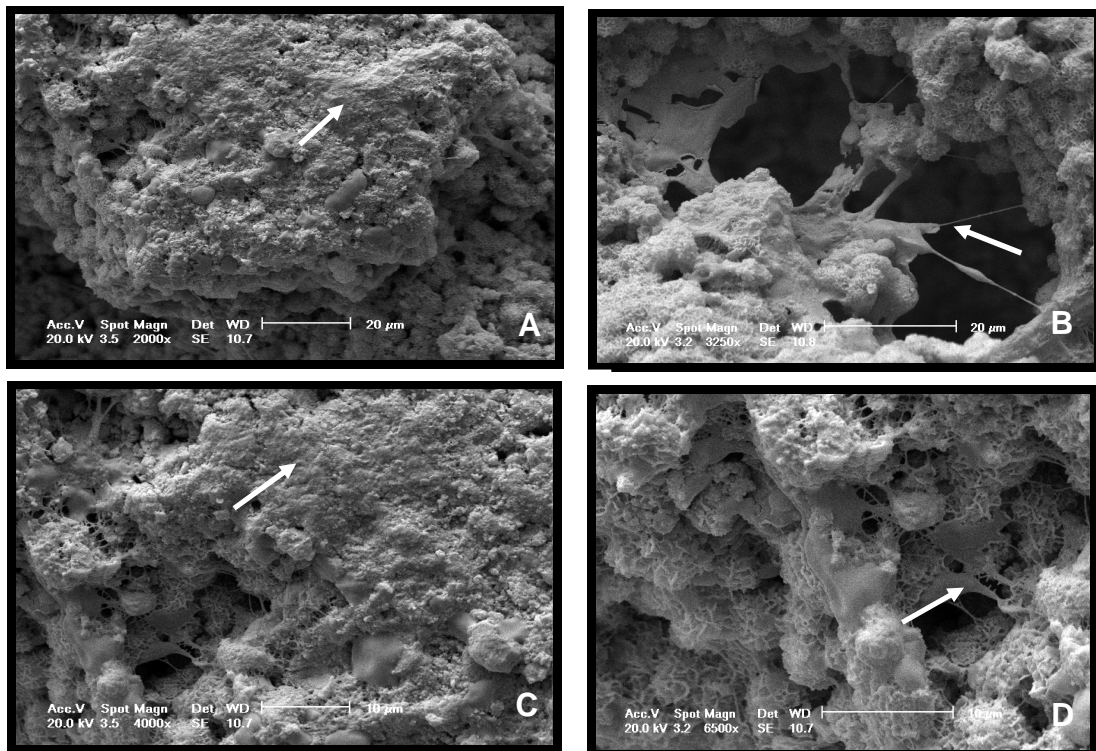


Figura 9: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC no 10º dia de cultura. A) Magnificação de 2000x, seta: deposição de matriz extra-celular, B) Magnificação de 3250x, seta: prolongamentos celulares. C) Magnificação de 4000X, seta: deposição de matriz extra-celular. D) Magnificação de 6500x, seta: prolongamentos celulares.

No 10º dia de experimento é possível observar a deposição de matriz extra-celular sobre o biomaterial (FIGURAS 9.A e 9.C). No interior dos poros, observa-se prolongamentos celulares (FIGURAS 9.B e 9.D). As células começam a apresentar um aspecto mais cuboidal.

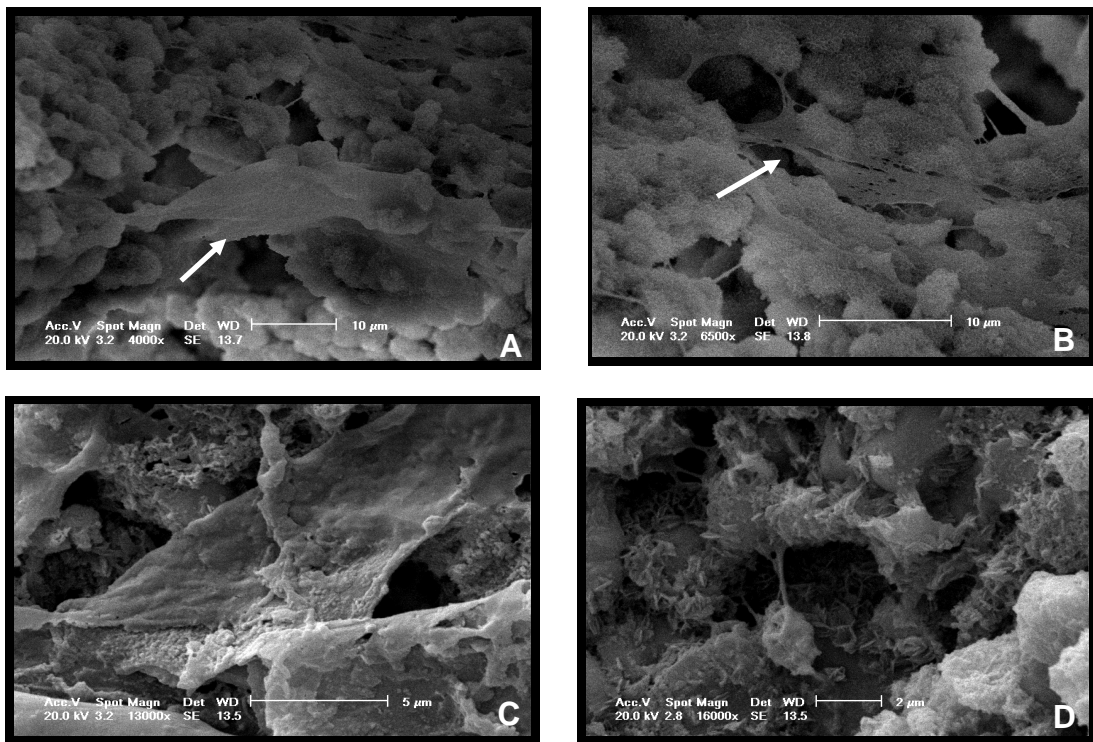


Figura 10: Fotomicrografias eletrônicas das células aderidas sobre a superfície macroporosa de CFC após 15 dias de cultura. A) Magnificação de 4000x, seta: célula com aspecto cuboidal, B) Magnificação de 6500x, seta: conexões entre as células. C) Magnificação de 13000X. D) Magnificação de 16000x.

No 15º dia de cultura observa-se células com aspecto cuboidal (FIGURA 10.A), compatível com a morfologia correspondente a das células osteogênicas. É possível observar o estabelecimento de conexões entre as células (FIGURA 10.B), bem como a migração das mesmas e de seus prolongamentos para o interior dos poros.

5.3 PCR EM TEMPO REAL PARA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS OP, OC E ALP

A expressão dos genes *BGLA* e *SSP1* que codificam as proteínas osteocalcina e osteopontina, respectivamente, bem como a atividade da fosfatase alcalina foram detectadas pela técnica do QT-PCR.

Para a mensuração, o valor do ciclo limiar, C_T , foi determinado pelo termociclador. A partir da análise em duplicata, obteve-se a média e o desvio-padrão dos valores de C_T encontrados.

Tabela 1 – Valores de C_T para a expressão dos genes β -actina, *BGLA*, *SSP1* e ALP nos diferentes períodos de cultura

| | B-Actina | ALP | SSP1 (Osteopontina) | BGLA (Osteocalcina) |
|----------------|-----------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 05 dias | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 dias | 53 ± 0,14 | 40,95 ± 0,21 | 38,8 ± 0,14 | 35,45 ± 0,07 |
| 15 dias | 42,6 ± 0,14 | 34,35 ± 0,35 | 37,5 | 34,65 ± 0,07 |

Os valores de C_T expressam o ciclo no qual o gene começou a ser expresso. Quanto menor o valor do C_T , mais cedo foi detectada a expressão do gene.

No quinto dia de cultura não foi detectada a expressão de nenhum dos genes investigados, provavelmente por haver um número muito pequeno de células, o que resultou em um quantidade insuficiente de mRNA para ser detectada pela técnica de PCR. Já no 10º e 15º dias de cultura, foi detectada a expressão de todos os genes investigados, sendo que os valores de C_T foram menores para todos os genes no 15º dia de cultura, indicando que a detecção da expressão dos genes investigados ocorreu mais precocemente neste período, o que nos leva a concluir que as células estavam expressando uma maior quantidade de proteínas e, portanto, estavam mais diferenciadas neste período de cultura. Também é possível confirmar que houve proliferação celular e diferenciação das células-tronco mesenquimais em células de linhagem osteogênica, já que as proteínas investigadas são consideradas marcadores osteoblásticos, em especial, a osteocalcina e a fosfatase alcalina.

Os níveis de expressão relativa de cada gene foram normalizados com a expressão do gene da β -actina na relação ($C_{T(OP/OC/ALP)}/C_{T(\beta\text{-actina})}$), onde obtivemos os valores descritos a seguir.

Tabela 2- Valores de C_T normalizados da expressão dos genes ALP, *SSP1* e *BGLA*

| | ALP | SSP1 (Osteopontina) | BGLA (Osteocalcina) |
|----------------|------|------------------------|------------------------|
| 05 dias | — | — | — |
| 10 dias | 0,77 | 0,73 | 0,66 |
| 15 dias | 0,80 | 0,88 | 0,81 |

Após a normalização dos valores de C_T , foi possível comparar a expressão relativa dos genes, nos períodos estudados, e observa-se, pela tabela acima, que, no período de 15 dias, houve uma maior expressão de todos os genes investigados.

5.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR NOS POÇOS SEM ARCABOUÇO

Os poços-controle foram utilizados para análise da morfologia celular nos diferentes períodos de cultura, sem a presença do arcabouço.

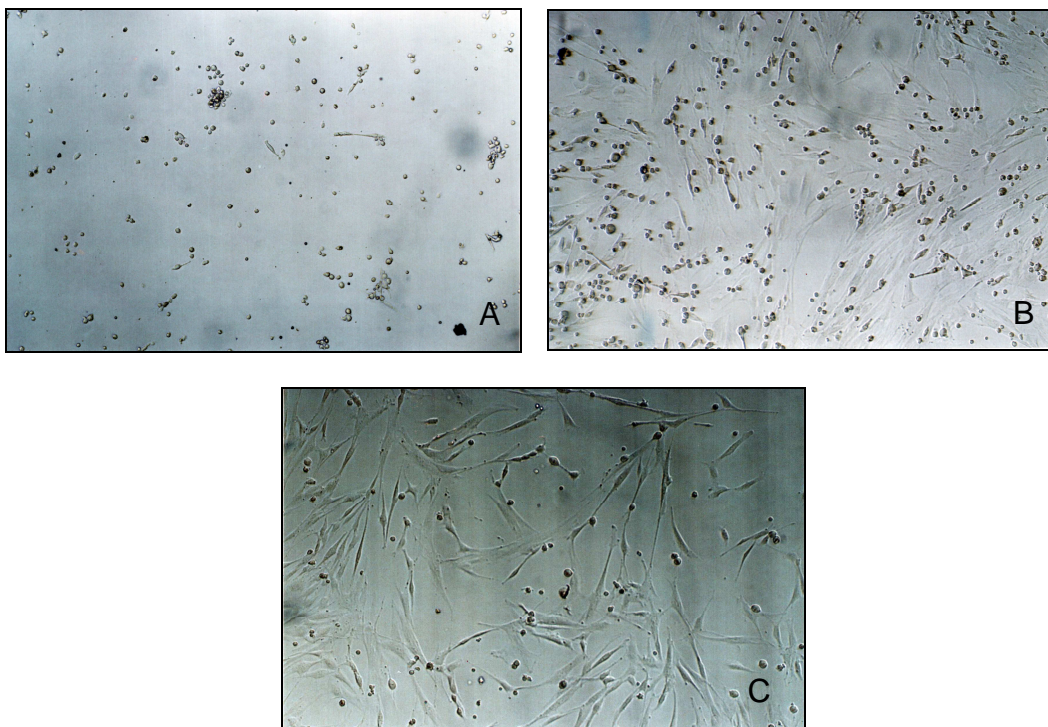


Figura 11: Desenvolvimento das células de medula óssea nos diferentes períodos de cultura sem a presença dos arcabouços. Magnificação de 100x. A) 05 dias de cultura. B) 10 dias de cultura. C) 15 dias de cultura.

No quinto dia de cultura, observa-se um número pequeno de células arredondadas, com pequenas variações de tamanho e aderidas à superfície. São observadas colônias simples e isoladas de células (FIGURA 11.A).

No décimo dia, observou-se um aumento considerável no número de células e estas apresentavam-se fortemente aderidas, com citoplasma prolongado e aspecto fusiforme (FIGURA 11.B).

No décimo quinto dia de cultura, as células apresentaram aspecto cuboidal compatível com a morfologia de células osteogênicas. Observam-se as células com extensão dos prolongamentos, sugerindo o estabelecimento de conexões entre as colônias (FIGURA 11.C).



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Inúmeros materiais têm sido investigados como potenciais arcabouços para engenharia de tecido ósseo, cada um deles apresentando vantagens e limitações. Neste estudo optou-se por pesquisar o CFC, desenvolvido com matéria-prima brasileira, em virtude de seu baixo custo em relação aos cimentos importados disponíveis comercialmente, já que sua biocompatibilidade e facilidade de manuseio demonstraram ser similares. As técnicas de imagem e os diferentes testes realizados neste estudo nos forneceram um melhor entendimento do desenvolvimento celular em contato com o cimento de fosfato de cálcio.

Uma das características exigidas dos arcabouços para engenharia de tecido ósseo é que apresentem uma estrutura porosa e interconectada, que permita a migração e distribuição das células (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005). Com este objetivo, optou-se pela utilização de esferas de parafina como corpo gerador de poros nos arcabouços. A parafina foi escolhida por ser um material orgânico de baixo ponto de fusão, que permitiu que se controlasse a distribuição e o tamanho dos poros, obtendo-se, então, um arcabouço macroporoso e interconectado. Além disso, a parafina destaca-se por ter inércia química, fazendo com que não haja nenhuma reação com o cimento ou a fase líquida, e por ser de baixo custo (MACHADO, 2007).

Uma das principais vantagens do CFC em relação a outros materiais, inclusive cerâmicas, é o fato dele apresentar biodegradabilidade a uma taxa proporcional com a remodelagem (YUAN et al., 2000; MACHADO, 2007) característica esta bastante desejada em arcabouços para engenharia tecidual, já que se visa a substituição do biomaterial por osso novo. Essa característica deve-se ao fato do CFC ser precipitado em temperatura ambiente, o que lhe confere uma baixa cristalinidade, ou seja, os átomos ficam desorganizados, há espaços entre eles e, portanto, a estrutura fica mais aberta e reagente, sendo este material mais facilmente solubilizado, fagocitado e por isso, reabsorvido.

A engenharia tecidual envolve a associação de uma matriz osteocondutiva, no caso deste estudo, o CFC; células osteoprogenitoras e fatores de crescimento osteoindutores. A escolha das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana justificou-se por seu potencial de expansão e diferenciação em

linhagens específicas, combinado com sua origem autógena, o que as torna boas candidatas à engenharia tecidual e terapias regenerativas. Por apresentarem vantagens sobre outros tipos celulares, as CTM têm sido largamente utilizadas na engenharia de tecido ósseo (LI et al., 2005; LOGEART- AVRAMOGLU, 2005; GUO et al, 2009).

As proteínas ósseas morfogênicas (BMPs) desempenham um papel crítico na diferenciação de osteoblastos (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005). Na presente investigação, a Proteína Morfogênica Óssea-4 (BMP4) foi utilizada como fator indutor da diferenciação das células-tronco mesenquimais em células osteogênicas, método este já empregado com sucesso por Loro (2002) e Silva Júnior (2003). A diferenciação das células-tronco mesenquimais em células da linhagem osteogênica pôde ser comprovada pela detecção, através do QT-PCR, da expressão dos genes que codificam as proteínas osteopontina e osteocalcina, bem como da atividade da fosfatase alcalina, que é outro marcador osteoblástico bastante específico.

Ainda não há consenso na literatura em relação ao tamanho de poro que mais favorece a osteocondução. Autores como Oh et al. (2007) e Lien et al. (2009) afirmam que o tamanho do espaço para o crescimento das células é um fator chave para o metabolismo celular e que o tamanho dos poros do arcaço influencia fortemente a proliferação celular. Segundo eles, isso pode ser explicado pelo fato de que os poros devem apresentar tamanho suficiente para que as células mantenham seus fenótipos, e desempenhem, com isso, suas funções normais, proliferando e secretando mais matriz extra-celular. Para Chou et al.(1995), a forma que as células adquirem tem relação com o crescimento celular, com a expressão de genes, com o metabolismo da matriz extra-celular e com a diferenciação celular.

Para o crescimento ósseo ocorrer, o poro deve ser grande o bastante para acomodar as células, juntamente com o sistema de irrigação sanguínea. Geralmente, um tamanho de poro superior a 100µm e inferior a 400µm é considerado ideal para osteocondução (BOYAN et al., 1996; TEMMENOF et al., 2000), embora haja relatos científicos conflitantes demonstrando crescimento ósseo em poros com menos de 100µm e mais de 50µm (CYSTER et al., 2005). Neste estudo, optou-se por adotar a faixa granulométrica de 100 a 250µm, por ser uma porosidade que permite o crescimento celular, mas que ainda não interfere consideravelmente na resistência mecânica do biomaterial, já que há uma estreita

relação entre a mesma e a quantidade e tamanho dos poros (CHOUTEAU et al., 2003).

É válido ressaltar que o tamanho de poro necessário para o crescimento ósseo difere em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Há relatos de poros com apenas 80µm em estudos *in vivo* que permitiram o crescimento de tecido ósseo. Isso pode ser explicado pelas diferenças significativas existentes entre os mecanismos pelos quais as células aderem à superfície do arcabouço *in vitro* e *in vivo* (BAKSH; DAVIES, 2000).

A diferenciação celular foi avaliada por meio de MEV e pelo QT-PCR, através do qual foi verificada a expressão dos genes *BGLA* e *SSP1*, que codificam as proteínas osteocalcina e osteopontina, respectivamente, bem como a atividade da fosfatase alcalina. Através da MEV, foi possível confirmar a proliferação das células sobre o arcabouço de CFC, bem como a diferenciação destas em células osteogênicas, o que pode ser percebido pelo formato cuboidal, compatível com o formato das células osteogênicas, que as mesmas adquiriram próximo ao 15º dia de cultura. O QT-PCR corroborou estes achados, através da detecção da expressão dos genes investigados, nos períodos de 10 e 15 dias de cultura.

No quinto dia de cultura, a expressão de qualquer dos genes estudados não pôde ser detectada através da técnica de QT-PCR, inclusive não tendo sido detectada a presença de β -actina, que é um marcador constitutivo das células. Tal resultado sugere que, neste período de tempo, havia uma quantidade muito pequena de células na cultura, sendo a quantidade de moléculas de mRNA insuficientes para serem detectadas pela técnica de PCR. Nesse contexto, é válido ressaltar que as células utilizadas neste estudo foram provenientes de um doador adulto, com idade superior a 40 anos. Assim, a possibilidade de que o número de células-tronco mesenquimais fosse mais elevado e que seu potencial de diferenciação fosse maior se células da medula óssea de um paciente mais jovem tivessem sido utilizadas, não pode ser descartada.

No décimo e no 15º dia de cultura foi detectada, através do QT-PCR a expressão dos genes *BGLA* e *SSP1*, que codificam as proteínas osteocalcina e osteopontina, respectivamente, bem como a atividade da fosfatase alcalina, sendo que os resultados mostraram uma detecção mais precoce da expressão destes genes com o passar dos dias. Esses dados permitem concluir que houve proliferação celular, bem como diferenciação osteogênica das células nestes

períodos, já que estas proteínas são consideradas marcadores osteoblásticos, por serem expressas exclusivamente por células pré-osteogênicas e por osteoblastos maduros, com exceção da osteopontina que pode ser detectável em células precursoras em estágios relativamente precoces da diferenciação (OZAWA; KASUGAI, 1996; AUBIN, 1998).

Diversos autores têm chamado atenção para a necessidade dos arcabouços para engenharia de tecido ósseo apresentarem boas propriedades mecânicas (TEMENOFF et al., 2000), entretanto, pode-se concordar com Logeart-Avramoglou et al. (2005) e Cyster et al. (2005) quando afirmam que tais exigências não são necessárias já que a função principal do arcabouço é suportar o crescimento ósseo e não fornecer suporte para forças mecânicas. Para estes autores, quando necessário, uma estabilidade mecânica suficiente pode ser obtida através de aparatos ortopédicos apropriados como placas internas ou fixadores externos.

A resistência mecânica das amostras estudadas nesta pesquisa foi previamente mensurada por Machado (2007) e situou-se em torno de 3,6MPa. Os arcabouços apresentavam a resistência mínima suficiente para o manuseio dos mesmos, o que de certo modo já era suficiente, já que essa resistência seria aumentada com a proliferação de osteoblastos ao formar o tecido ósseo, e isto se dá de modo extracorpóreo, *in vitro*, sem grandes solicitações mecânicas. De qualquer forma, para um aumento da resistência mecânica dos arcabouços utilizou-se a solução com defloculante, pois desta forma haveria um aumento na compactação da pasta cimentícia, favorecendo um aumento da resistência (SANTOS, 2002).

Concordamos com Barralet et al. (2002) ao afirmar que, embora a resistência mecânica dos arcabouços de CFC macroporosos seja baixa, é evidente que isso não pode contra-indicar seu uso como arcabouço para engenharia de tecido ósseo. A principal exigência mecânica do arcabouço é manter a estrutura da camada tecidual enquanto a vascularização e o crescimento ósseo ocorrem. Uma vez que os arcabouços de CFC podem ser reabsorvidos, a sua resistência a longo prazo pode ser menos importante que a não-reabsorção das hidroxiapatitas sinterizadas, por exemplo.

O cimento de fosfato de cálcio apresenta-se como um material de uso potencial bastante forte na engenharia de tecido ósseo e sua associação com

materiais poliméricos é um campo bastante promissor a ser investigado em pesquisas futuras, visando, com isto, associar as vantagens de ambos os materiais.



CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados da presente pesquisa é possível concluir que:

- Os arcabouços de CFC, com macroporosidade criada por esferas de parafina, avaliados por meio de MEV, apresentaram poros interconectados e com dimensões compatíveis com o tamanho das esferas utilizadas, que foi entre 100 e 250 μ m.
- O CFC permite adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em células da linhagem osteogênica, podendo ser utilizado como arcabouço para engenharia tecidual.
- A diferenciação das células-tronco mesenquimais em células osteogênicas foi confirmada pela detecção da expressão dos genes *BGLA* e *SSP1* que codificam as proteínas osteocalcina e osteopontina, respectivamente bem como a atividade da fosfatase alcalina, outro marcador osteoblástico, nos períodos de 10 e 15 dias de cultura.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p.667-681, 2000.

AKAHANE, M. et al. Osteogenic phenotype expression of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, n.4, p.561-571, 1999.

ARINZEH, T.L. et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**. V.26, p.3631-3638, 2005.

AUBIN, J.E. Advances in osteoblast lineage. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.76, n.6, p.899-910, 1998.

BAKSH, D.; DAVIES, J.E. Design strategies for 3-Dimensional in vitro bone growth in tissue-engineering scaffolds. In: DAVIES, J.E. **Bone Engineering**, Toronto, Canadá, p. 488-495, 2000.

BARRALET, J.E. et al. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. **Biomaterials**, V.23, p.3063-3072, 2002.

BOXER, M. Molecular techniques: divide or share. **J Clin Pathol**, v.53, n.1, Jan, p.19-21, 2000.

BOYAN, B.D. et al. Role of materials surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, V. 17, p. 137-146, 1996.

de BRUIJN et al. Osteoinductive biomimetic Calcium-phosphate coatings and their potential use as tissue-engineering scaffolds. In: DAVIES, J.E. **Bone Engineering**, Toronto, Canadá, p.421-431, 2000.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAN, J.KF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. V. 21, N. 23, p. 2347-59, 2000.

BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real –time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n.4, Oct, p.365-79, 2005.

CARRODEGUAS, R.G. et al. Cimentos de fosfato de cálcio. **Biotecnologia**. v. 10, p. 30-2, 1999.

CERRONI, L. et al. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. **Biomolecular Engineering**. v. 19, p. 119-124, 2002.

CHANG, B.S. et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. **Biomaterials**, v.21, p. 1291-1298, 2000.

CHOU, L. et al. Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v.108, p.1563-1573, 1995.

CHOUTEAU, J. et al. Cellular culture of osteoblasts and fibroblasts on macroporous calcium-phosphate bone substitutes. **Revue de Chirurgie Orthopédique**, v. 89, p. 44-52, 2003.

CIPRANDI, M.T.O. **Análise qualitativa do cimento de fosfato tricálcico no tratamento de seqüelas de traumatismos orbitários**. (Dissertação de Mestrado). Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 2007.

CYSTER, L. A. et al. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. **Biomaterials**, V.26, p. 697-702, 2005.

DEPREZ, R.H. et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, V. 307, p. 63-69, 2002.

DRIESSENS, F. C. M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M. P.; BOLTONG, M. G.; PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anal. Quim. Int. Ed.**, v. 93, p. S38 - S43, 1997.

GAUTHIER, O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials**, v.19, p. 133-139, 1998.

GUO, H. et al. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.5, p.268-278, 2009.

KASTEN, P. et al. Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. **Acta Biomaterialia**, v.4, p.1904-1915, 2008.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanism of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, n. 8, p. 147-159, 2002.

KATHURIA, N. et AL. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.5, p.406-418, 2009.

KIM, H.J. et al. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. **Biomaterials**, v. 26, p.4442-4452, 2005.

KRESSBACH, P. et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.10, n.2, p.165-181, 1999.

LEONEL, E. et al. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neformação óssea - estudo em ratos. **Cienc Odontol Bras**, v.6, n.3, p.19-25, 2003.

LI, W.J. et al. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. **Biomaterials**. v. 26, p. 5158-5166, 2005.

LIEN, S.; HO, L.; HUANG, T. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p.670-679, 2009.

LIU, C. et al. Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. **Journal of Endodontics**, v.23, n.8, 1997.

LOGEART-AVRAMOGLU, D. et al. Engineering bone: challenges and obstacles. **J. Cell. Mol. Med.** v. 9, n.1, p.72-84, 2005.

LONG, M. Osteogenesis and bone marrow derived cells. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.27, n.3, p.677-690, 2001.

LORO, R. C. D. Estudo in vitro da osteoindução de células da medula óssea humana. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 137p. 2002.

MA, P. X. Tissue Engineering. In: KROSCWITZ, J. I. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology** 3.ed. NJ: John Wiley & Sons, 2004.

MACHADO, J. Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como suporte para o crescimento de tecidos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 104 p, 2007.

MALAVAL, L. et al. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.74, n.4, p.616-627, 1999.

MARTINS, A et al. Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v.4, p.1637-1645, 2008.

MAUNEY, J. et al. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cencellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Biomaterials**. v. 26, p. 3173-3185, 2005.

MEYER et al. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part I. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, p.325-332, 2004.

MORAES, P. et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n.4, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>

MUELLER, S.M.; GLOWACKI, J. Construction and regulation of 3-dimensional bone tissue in vitro. In: DAVIES, J.E. **Bone Engineering**, Toronto, Canadá, p. 473-486, 2000.

NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M.. PCR em Tempo Real. Ver. **Biotechnol Cien Desenv**, p.33, 2004.

OH, S.H. et al. In vitro e in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. **Biomaterials**, v.28, p.1664, 1671, 2007.

OZAWA, S.; KASUGAI, S. Evaluation of implant materials (hydroxyapatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture. **Biomaterials**, v. 17, p. 23-29, 1996.

PITTENGER, M. et al. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 02, p. 143-146, 1999.

REILLY, G.C. et al. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. **Biomaterials**, v. 28, p. 4091-4097, 2007.

RIMINUCCI, M., BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n.8, p. 1027-1036, 2003.

ROSSA Jr., C. et al. Citotoxicity of two novel formulations of calcium phosphate cements: a comparative in vitro study. **Artificial Organs**, v. 29, n. 2, 2005.

SANTOS, LA. **Cimento de Fosfato de Cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica.** (Tese). Campinas: Universidade estadual de campinas; 2002.

SANTOS, L.A. et al. Cimento ósseo de fosfato de cálcio de dupla pega: avaliação *in vivo*. **Projeções**, v. 23, p. 47-53, 2005.

SANTOS, R.S. **Expressão Gênica da Família HCN em Ratos Com Epilepsia Induzida pela Pilocarpina e em tecido Hipocampal e Cortical Humano.** Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 158p, 2008.

SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J.; MILAM, S. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 57, p. 1122-1126, 1999.

SHIMIZU, K.; YOSHIKAWA, H.; TAKAOKA, K. Local effects of bone morphogenetic protein-4 on skeletal tissues. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA. n. 318, p. 243-250, 1995.

SILVA JR, A. **Análise *in vitro* da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana, cultivadas sobre discos de titânio e submetidas à irradiação com laser não-cirúrgico.** Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 128p, Porto Alegre, 2003.

TEMENOFF, J.S., LU, L., MIKOS, A.G. Bone Tissue Engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: DAVIES, J.E. **Bone Engineering**, Toronto, Canadá, p. 454-460, 2000.

TURHANI, D. et al. Analysis of cell-seeded 3-dimensional bone constructs manufactured in vitro with hydroxyapatite granules obtained from red algae. **Journal of oral and Maxillofacial Surgery**. v. 63, p. 673-681, 2005.

YUAHN, H. et al. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. **Biomaterials**. V. 21, p. 1283-90, 2000.





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

Porto Alegre 04 de abril de 2003.

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0008/03

Intitulado: *Análise In Vitro de Biosistemas Célula-Titânio Frente à Irradiação com Laser Não-Cirúrgico*

do(a) aluno(a): *Aurelício Novaes Silva Júnior*

Programa de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Prof. Dr. Ruben Weismann*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 20 de março de 2003.

Este projeto deverá ser encaminhado ao CEP/PUCRS

Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck

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



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 223 /03-CEP

Porto Alegre, 09 de abril de 2003.

Ilmo(a) Sr(a)
Dout Aurelício Novaes Silva Junior
N/Universidade

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa intitulado: "Análise in vitro de
Biosistemas Célula-Titânio frente a irradiação com laser não-circirúrgico".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper
Coordenador do CEP-PUCRS

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Resolução 196/96 do CNS/MS

Título da pesquisa: **A Utilização do Cimento de Fosfato de Cálcio como Arcabouço para Engenharia de Tecido Ósseo: estudo *in vitro*.**

Sr. Paciente:

O senhor(a) tem indicação de cirurgia para remoção de enxerto ósseo da crista do osso ilíaco, objetivando a reconstrução da maxila para posterior colocação de implantes dentários, o que possibilitará uma reabilitação oral completa. Dentro deste osso que será removido pelo seu Cirurgião-responsável, existem células (chamadas células de medula óssea) que, durante a coleta do osso, morrem naturalmente devido ao processo cirúrgico e serão descartadas pelo seu cirurgião. Estas células que serão, inevitavelmente, descartadas poderão ser aproveitadas em uma pesquisa que tem por objetivo desenvolver novas técnicas e materiais que possam ajudar na reabilitação de pacientes que buscam o nosso serviço com o objetivo de também serem reabilitados.

Os procedimentos a serem utilizados: Esclarecemos que tal coleta só poderá ser realizada quando estiver ocorrendo a sua cirurgia para reconstrução maxilar com enxerto de osso ilíaco. Estas células serão removidas, com seringas e curetas, da medula que se encontra junto ao osso ilíaco já removido, que será destinado à enxertia proposta no maxilar. Depois disto, as células serão utilizadas na nossa pesquisa em laboratório e feito isto, serão finalmente descartadas.

Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

A justificativa e os objetivos desta pesquisa: Este estudo visa beneficiar todos aqueles pacientes que por qualquer razão vieram a perder seus dentes de forma precoce e, por conseguinte, apresentam necessidade de reabilitação com implantes. Será verificada a interação das células com outros materiais biocompatíveis com o intuito de desenvolver técnicas e materiais que ajudem aos pacientes a terem cada vez melhores materiais a sua disposição.

Caso o senhor concorde em participar do estudo em questão, por favor leia com atenção, preencha e assine este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme se segue:

Eu, _____ (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima descrita de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito dos procedimentos a serem executados e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e

modificar minha decisão se assim eu desejar. A Dra. Taís Somacal Novaes Silva (Pesquisadora Responsável) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes às células de medula óssea do meu corpo serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa face a essas informações.

Caso eu tenha novas perguntas ou dúvidas sobre este assunto, ou ainda qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso contactar, imediatamente, a Dra. Taís Somacal Novaes Silva ou a Dra. Denise Cantarelli Machado (Orientadora).

Declaro que recebi cópia do presente termo de consentimento.

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Data:

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____

Data:

Nome do Orientador: _____

Assinatura: _____

Data;

Este formulário foi lido para _____

1.a Via Paciente

2.a.Via Pesquisador