

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

**CULTIVO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA SOBRE MEMBRANAS DE
COLÁGENO BOVINO E ARCABOUÇOS DE ÁCIDO POLIGLICÓICO POLILÁTICO (PLGA)**

Autor: **Guilherme Genehr Fritscher**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2007.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

Linha de Pesquisa: Biocompatibilidade de Materiais

**CULTIVO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA SOBRE MEMBRANAS
DE COLÁGENO BOVINO E ARCABOUÇOS DE ÁCIDO POLIGLICÓICO
POLILÁTICO (PLGA)**

Guilherme Genehr Fritscher

(Bolsista CAPES)

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

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Orientadora

Porto Alegre

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Cezar e Angélica grandes influenciadores da minha carreira. Dedicaram suas vidas para proporcionar momentos como este a seus filhos.

Aos meus irmãos, Clarissa e Leandro, verdadeiros amigos de toda uma vida.

A minha linda e amada namorada, Roberta, por toda a companhia durante esses difíceis períodos de especialização e mestrado.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a vida.

Aos meus pais, Cezar e Angélica e irmãos, Clarissa e Leandro, por constituírem uma família de dignidade, amizade e companheirismo. Devo tudo a eles.

Aos meus avós, Zeli e Edgar e Leda e Hélio (in memorian), os formadores desta família, grande exemplo de caráter e luta na vida.

À minha namorada Roberta e seus pais, Maristela e Roberto por acreditarem em mim nesses últimos anos, sempre me apoiando e incentivando.

À minha orientadora, Denise, por me ensinar e orientar durante todo esse período. Sua dedicação ao trabalho é um exemplo a ser seguido.

À Faculdade de Odontologia, na pessoa de Seu Diretor, Prof. Dr. Marcos Túlio, e seu vice-diretor, Profa. Dra. Angélica Fritscher, e demais professores e funcionários que me acolheram nesses meus últimos anos de formação profissional.

À Pontifícia Universidade Católica, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Irmão Joaquin Clotet, e seu Vice-Reitor, Irmão Evilázio Teixeira, por proporcionar formação profissional de extrema qualidade e incentivo à pesquisa

A Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, por seu incrível trabalho de fortificar a pesquisa nessa Instituição.

Aos professores do Programa do Curso de Mestrado em Odontologia, em especial ao professores Daniela Nascimento e Silva, Rogério Belle, Rogério Pagnoncelli,

Ruben Weismann, Manoel Sant'Ana Filho, Suzana Rizatto e Marília Gerhardt de Oliveira, por seus ensinamentos durante o curso.

Ao meu amigo e colega de cirurgias Rodrigo Beltrão, grande companheiro nesses últimos anos.

Aos Drs. Elmo Finco, Norton Finco, Aline Abreu representando a DIS, minha nova equipe de trabalho, por acreditarem na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Gilson Beltrão, amigo, chefe e influenciador direto na escolha de minha linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Claiton Heitz, grande amigo, professor e exemplo de cirurgião.

À Dra. Carla Soviero, exemplo de dedicação aos pacientes, grande contribuidora para a minha formação cirúrgica.

Aos Hospitais São Lucas da PUCRS e Cristo Redentor, por permitirem o aprimoramento profissional.

Aos colegas de turma, Carla, Danilo, Karis, Marcelo Abreu e Marcelo Ferraro por nesses dois anos formarem uma equipe muito forte, sendo um incentivo ao aprimoramento profissional.

Ao meu colega Marconi Maciel Santos, verdadeiro amigo, grande companheiro nessa difícil caminhada.

Aos colegas da turma de Ortodontia da Faculdade de Odontologia PUCRS, pela dedicação e amizade construídos durante o curso.

Aos médicos Dr. Gérson Ávila e Dr. Rafael Ott, pela ajuda na obtenção da amostra para essa pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisa Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS, e seu Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias, por oportunizar a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias Jeremiah Lubianca, Vinicius Schenk Michaelsen, Tiago Giuliani e Isabel, em especial Christian Viezzer, por todo o auxílio na realização da pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia, Ana, Carlos, Davenir e Marcos

Às funcionárias do ambulatório de Cirurgia da Faculdade de Odontologia, Luiza e Carla pela constante ajuda prestada.

A CAPES por disponibilizar a oportunidade de realizar esse curso.

SUMÁRIO

SUMÁRIO:

Lista de abreviaturas	2
Lista de figuras	5
Lista de tabelas	10
Resumo	12
Abstract	14
1. Introdução	15
2. Objetivos	19
3. Revista de literatura	21
4. Metodologia	45
5. Resultados	60
6. Discussão	92
7. Conclusões	103
Referências	105
Anexos	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aFGF	Fator de crescimento de fibroblasto ácido
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BMP	Proteína morfogenética óssea
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CMI	Célula mesenquimal indiferenciada
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Graus centígrados
DEPC	Dietilpirocarbonato
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxirribonuclease
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
dT	Dideoxitimidina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Fluoresceína
<i>g</i>	Força gravitacional
g	Gramas(s)
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina-II
H ₂ O	Água
IgG	Imunoglobulina G

M	Molar
rhBMP-4	Proteína morfogenética óssea-4 recombinante humana
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	nanogramas
pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PLGA	Ácido poliglicólico e polilático
PRP	Plasma rico em plaquetas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
rh	Recombinante humana
RNA	Acido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
TGF-β	Fator de crescimento e transformação-β
TGF-β2	Fator de crescimento e transformação-β2
U	Unidade
USA/EUA	<i>United States of América</i> / Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro
μM	Micromolar
®	Marca registrada
%	Por cento

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A. Punção para a aspiração da medula óssea da crista do ilíaco. B. Seringas contendo aproximadamente 30 mL de sangue da medula óssea. 51
- Figura 2.** Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA no sexto dia de cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença núcleos marcados. Aumento 10x. 66
- Figura 3.** Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA no sexto dia de cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. A seta aponta um núcleo marcado (seta). Aumento 10x. 66
- Figura 4.** Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (setas). Aumento 10x. 67
- Figura 5.** Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura, sem adição de rhBMP-4 ou PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 67
- Figura 6.** Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 68
- Figura 7.** Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (setas). Aumento 10x. 68
- Figura 8.** Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 69
- Figura 9.** Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 69
- Figura 10.** Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 70
- Figura 11.** Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 71
- Figura 12.** Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 71
- Figura 13.** Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados. Aumento 40x. 72

- Figura 14.** Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 72
- Figura 15.** Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 73
- Figura 16.** Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 73
- Figura 17.** Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de poucos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 74
- Figura 18.** Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados. Aumento 10x. 74
- Figura 19.** Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 75
- Figura 20.** Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura controle) marcado com Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de poucos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 75
- Figura 21.** Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de um núcleo marcado (seta). Aumento 40x. 76
- Figura 22.** Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 76
- Figura 23.** Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 77
- Figura 24.** Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura) com marcador de Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de dois núcleos marcados. Aumento 40x. 77
- Figura 25.** Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 78
- Figura 26.** Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de alguns núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 78
- Figura 27.** Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a diminuição de núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 79

- Figura 28.** Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura, sem adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x. 79
- Figura 29.** Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de um núcleo marcado (seta). Aumento 40x. 80
- Figura 30.** Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 40x. 80
- Figura 31.** Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x. 81
- Figura 32.** Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 40x. 81
- Figura 33.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com BMP, com coloração de HE. Presença de célula aderida ao substrato de colágeno (seta). Aumento 100x. 83
- Figura 34.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Presença de célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x. 83
- Figura 35.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com PRP, com coloração de HE. Observa-se célula com núcleo e citoplasma volumoso aderido ao colágeno (seta). Aumento 100x. 84
- Figura 36.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura sem BMP ou PRP, com coloração de HE, sem células aderidas. Aumento 100x. 84
- Figura 37.** Fotomicrografia do arcabouço de PLGA no nono dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Observam-se células aderidas ao substrato (seta). Aumento 100x. 85
- Figura 38.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com BMP, com coloração de HE. Presença de célula aderida (seta). Aumento 100x. 85
- Figura 39.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Presença de célula aderida (seta). Aumento 100x. 86
- Figura 40.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com PRP, com coloração de HE. Célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x. 86
- Figura 41.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no vigésimo primeiro dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Célula aderida ao substrato (seta). Aumento 100x. 87

- Figura 42.** Fotomicrografia da membrana de Colágeno no vigésimo primeiro dia de cultura com PRP, coloração de HE. Célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x. 87
- Figura 43.** Fotomicrografia da placa de poliestireno usadas neste estudo. Poucas células aderidas (seta). Cultura de CMI com arcabouço de PLGA na presença de rhBMP-4. Aumento 40x. 88
- Figura 44.** Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA e na presença de rhBMP-4 e do gel de PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblasto (seta branca). 89
- Figura 45.** Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA e na presença do gel de PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblastos (seta branca). 89
- Figura 46.** Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA. Poucas células aderidas (seta). 90
- Figura 47.** Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença de rhBMP-4. Células aderidas com características de osteoblastos (seta). 90
- Figura 48.** Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença de rhBMP-4 e PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblasto (seta branca). 91
- Figura 49.** Fotomicrografia da placa de poliestireno usadas nesse estudo. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença do gel de PRP. Hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblastos (seta branca) presentes. 91
- Figura 50-** Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR osteopontina. Marcador de peso molecular de 123pb (M). Grupos B2 e B3 no décimo quarto dia; e A2 e A3 no vigésimo primeiro dia. 94

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos subgrupos em relação ao dia de análise, quando corados com Iodeto de Propídio.	62
Tabela 2- Amostragem da relação dos subgrupos com os dias analisados, quando corados com HE.	79
Tabela 3- Resultados do PCR em tempo real para a expressão de β -actina, Osteopontina e Osteocalcina. Valores em nanogramas.	90

RESUMO

RESUMO

O estroma da medula óssea, além de conter uma população heterogênea de células conjuntivas, nervosas e hematopoiéticas, mantém uma quantidade de células com características de células tronco (células mesenquimais indiferenciadas). Estas possuem capacidade de se diferenciarem em qualquer célula de natureza conjuntiva quando estimuladas pelo organismo. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a adesão, a proliferação e a diferenciação de células mesenquimais da medula óssea cultivadas sobre membrana de colágeno bovino e sobre arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA) com a adição do gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e/ ou da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-4). As células foram coletadas da medula óssea da crista do osso íliaco humana e separadas por técnica específica. As células foram cultivadas em dois suportes: membrana de colágeno e arcabouço de PLGA, e receberam 4 tratamentos distintos: (1) com rhBMP-4, (2) com rhBMP-4 e PRP, (3) com PRP e (4) controle (somente meio de cultura). Os subgrupos foram avaliados em 6, 9, 14 e 21 dias. Foram realizadas análises microscópicas das membranas e arcabouços com as colorações de Iodeto de Propídio e de Hematoxilina e Eosina. Foi feito PCR em tempo real a fim de se avaliar a expressão de osteopontina e osteocalcina e PCR convencional para osteopontina. Os resultados mostraram adesão celular tanto na membrana de colágeno como no arcabouço de PLGA. Sugere-se haver uma maior proliferação e diferenciação celular nos grupos que foram adicionados PRP, e rhBMP-4 e PRP juntos. Nos grupos com rhBMP-4 parece haver uma maior diferenciação celular que o grupo controle. Os dados obtidos indicam que o PRP e/ ou a presença de rhBMP-4 induzem adesão, proliferação e diferenciação de células da medula óssea em células de linhagem osteogênica.

Descritores: células de medula óssea; biomateriais; plasma rico em plaquetas; proteína morfogenética óssea; membrana de colágeno, PLGA.

ABSTRACT

The bone marrow besides having a high number of heterogenic cells, like connective, hematopoietics, and neuronal cells, also presents a great number of stem cells. These cells are pluripotent, so can differentiate in any connective cell when a stimulus is given. The aim of this study was to evaluate bone marrow stem cells adhesion, proliferation, and differentiation to osteoblast in vitro, over a collagen membrane and a poli-lactic (glycolic) acid scaffold (PLGA), using either recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-4) and platelet rich plasma (PRP). Bone marrow cells were aspirated from iliac crest and purify using specifics techniques. These cells were separated in main big groups cultured over collagen membrane and PLGA scaffold. Each culture had 4 distinct treatments: (1) with rhBMP-4; (2) with rhBMP-4 and PRP; (3) with PRP; and (4) control (only standard medium). The groups were evaluated after 6, 9 14 and 21 days. Microscopic analysis of collagen membrane and PLGA scaffold were performed using either Propidium Iodide, and Eosin and Hematoxilin. Real time PCR was performed to identify the expression level of osteopontin and osteocalcin, and standard PCR to osteopontin. The results showed cellular adhesion in both biomaterials, and suggest a higher cell proliferation and differentiation in rhBMP-4 and PRP, and PRP groups. The groups with rhBMP-4 had more differentiate cells that control group. The data obtained here indicate that PRP and/ or rhBMP-4 induce adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow stem cells into osteogenic lineage.

Key words: bone marrow stem cells; biomaterials; platelet rich plasma; morphogenetic bone protein; collagen membrane; PLGA

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Muitas pessoas necessitam recompor a estrutura óssea perdida por extrações precoces de dentes, trauma ou patologias com enxertos ósseos. O desenvolvimento de novas abordagens cirúrgicas e o emprego de biomaterial para enxertia visam melhores resultados em termos de prognóstico, tempo de recuperação e menor morbidade.

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

O tecido ósseo passa constantemente por um processo morfológico dinâmico seguindo sua formação original. Desta forma, o metabolismo ósseo é mantido por um constante processo de reabsorção e neoformação em resposta a mudanças físicas e biomecânicas. Este evento é controlado por dois mecanismos: a regulação sistêmica e a local, que através de hormônios controlam os níveis de cálcio e fosfato. Junto a isso ainda existem os fatores de crescimento que atuam sobre todas as células da

estrutura óssea auxiliando no processo de reparo tecidual (Moham e Bayklin, 1991; Marx, 1998; Anitua, 1999).

Recentemente o uso plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido difundido. O PRP é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autógeno e sua estratégia terapêutica baseia-se na aceleração da cicatrização através da concentração dos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas (Marx, 1998; Beltrão e Andrade, 2001).

O estroma da medula óssea, além de conter uma população heterogênea de células conjuntivas, nervosas e hematopoiéticas, mantém uma quantidade de células com características de células tronco (células mesenquimais indiferenciadas-CMI). Estas possuem capacidade de se diferenciarem em qualquer célula de natureza conjuntiva quando estimuladas pelo organismo (Krebsbach et al., 1999).

Conforme Aubin (1998), as células tronco e as células progenitoras primitivas são originadas na fase embrionária através de mecanismos pouco conhecidos e persistem em repouso formando uma delgada camada no tecido ósseo de adultos. Estas células contribuem para a reposição de osteoblastos na renovação óssea e na cicatrização de fraturas.

A medula óssea de indivíduos adultos contém células tronco mesenquimais, entre outras, sendo possível caracterizar e isolá-las da medula óssea coletada da crista do osso ilíaco (Pittenger et al., 1999).

O ciclo de vida de uma CMI é um processo regulado por cinco atividades fundamentais: ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência (ou morte) (Muschler e Midura, 2002).

A diferenciação das CMI tem sido investigada nos últimos anos, sendo que a indução da diferenciação celular, *in vitro*, de células mesenquimais em osteoblastos já é dominado com a utilização de rhBMP-4. Esta proteína óssea, sintetizada em laboratório, interfere positivamente nos períodos iniciais de cultura (Loro, 2002).

Portanto, esta pesquisa teve como objetivos avaliar a adesão, a proliferação e a diferenciação de células mesenquimais da medula óssea cultivadas sobre membrana de colágeno bovino e sobre arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA) com a adição do gel de plasma rico em plaquetas e/ ou da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-4) e avaliar a qualidade e velocidade da formação tecidual.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

a) avaliar a adesão das células mesenquimais da medula óssea humana cultivadas sobre membranas de colágeno bovino e sobre arcabouços de ácido poliglicólico polilático (PLGA), na presença da proteína morfogenética óssea humana (rhBMP-4) e/ ou plasma rico em plaquetas (PRP).

b) avaliar a capacidade de proliferação das CMI da medula óssea humana na presença de rhBMP-4 e/ ou PRP.

c) avaliar a capacidade de diferenciação das células mesenquimais da medula óssea humana cultivadas sobre membrana de colágeno e arcabouço de PLGA na presença rhBMP-4 e/ ou concentrado de plasma rico em plaquetas PRP.

3 REVISTA DE LITERATURA

3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA

Urist, Delange e Finerman (1983) enfatizaram que o osso difere dos demais tecidos não somente por sua estrutura fisiomecânica, mas também por sua extraordinária capacidade de crescer e manter contínuos remodelamento e regeneração.

Mohan e Baylink (1991) salientaram que o metabolismo ósseo é mantido por um contínuo processo de reabsorção e neoformação. Dois mecanismos têm sido postulados para o controle desse processo: regulação sistêmica, por meio de hormônios reguladores da taxa de cálcio e fosfato, e regulação local, na qual ocorre a participação de fatores de crescimento que atuam sobre células mesenquimais indiferenciadas, resultando em neoformação óssea.

De acordo com Gray (1994), o osso é um tecido complexo que está constantemente passando por um processo morfológico dinâmico, seguindo sua formação inicial, seu crescimento, seu reparo e sua remodelação, em resposta a mudanças físicas e biomecânicas sofridas pelo organismo.

Durante a totalidade de sua vida, o esqueleto é sujeito a constante remodelação, objetivando manter o tecido ósseo com suas propriedades

biomecânicas inalteradas. O remodelamento e a cicatrização de fraturas ósseas são exemplos da capacidade regenerativa do tecido ósseo graças à atuação das CMI e de sua ação progenitora (células osteoprogenitoras) (Muraglia, Cancedda e Quarto, 2000).

Conforme Ramoshebi et al. (2002), o osso possui uma estrutura de proteínas fortalecida por fosfato de cálcio, além de grande capacidade regenerativa, na qual todo o processo de formação ocorre a partir de uma integração biológica de processos bioquímicos, celulares e hormonais continuamente facilitados por um estado de deposição, reabsorção e remodelação ósseas. Existem três parâmetros fundamentais na engenharia tecidual óssea que vão determinar a capacidade de osteoindução: presença de sinais osteoindutores solúveis, a viabilidade das células mesenquimais indiferenciadas em responder e ter a capacidade de se diferenciarem em células formadoras de osso, além de uma adequada matriz extracelular.

3.2 CÉLULAS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS

De acordo com Caplan (1991), as CMI são células progenitoras pluripotentes, que se dividem muitas vezes e em diversos caminhos formando, entre outros, tecidos esqueléticos como, por exemplo, cartilagem, osso, tendão, ligamento, estroma da medula óssea, e tecido conjuntivo. Essas células não são governadas por si só ou limitadas a um número fixo de divisões mitóticas; a sua progênie é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos que, combinados, são responsáveis

pelo controle da expressão dos padrões moleculares e celulares, resultando em tecidos específicos, com funções também específicas, com base no seu repertório molecular. Ademais, durante a progressão da célula mesenquimal indiferenciada até a finalização de seu fenótipo, ela sofre a influência das regulações parácrina e autócrina, quando a soma de todos esses sinais intrínsecos e extrínsecos define o desenvolvimento e o fenótipo celulares.

O mesoderma origina todos os elementos do esqueleto. A habilidade que as células mesenquimatosas possuem de se espalhar e migrar, desde as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, entre as camadas ectodérmica e endodérmica, constitui o elemento-chave para todo reparo tecidual em organismos adultos relacionados à derme, aos ossos e aos músculos (Caplan, 1991). Reddi (1997) evidenciou que o osso adulto pode conter fatores que estimulam o reparo ósseo, recapitulando o desenvolvimento embrionário e a morfogênese.

Para Krebsbach et al. (1999), o estroma da medula óssea consiste de uma população heterogênea de células que fornece suporte estrutural e fisiológico para as células hematopoiéticas. Adicionalmente, esse estroma contém células com características de células tronco, as quais se diferenciam em osso, cartilagem, adipócitos, além de constituírem um suporte hematopoiético para os tecidos.

Segundo Petite et al. (2000), as células do estroma da medula óssea são comprometidas com a regeneração, recriando um meio embrionário em tecidos

adultos lesados. Além disso, os autores salientaram que tais células têm propensão de se aderirem em cultura, permitindo-se isolarem de outras células medulares, sendo possível verificar a sua proliferação e a diferenciação em osteoblastos, condroblastos, mioblastos e adipócitos.

Células hematopoiéticas estão amplamente associadas com células do estroma da medula óssea, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, quando essas células do estroma estão em cultura, as células hematopoiéticas bem diferenciadas são normalmente removidas por técnicas de lavagens seletivas e aderência (Aubin, 1999; Krebsbach et al., 1999).

Buscando utilizar as CMI como uma forma de terapia gênica visando o tratamento de lesões ósseas, Turgeman et al. (2001), em um trabalho realizado *in vitro*, transfectaram essas células derivadas da medula óssea com o vetor de adenovírus recombinante contendo a BMP-2 humana. Com as células transfectadas em cultura, observaram claramente a proliferação e a diferenciação osteogênica das CMI, enquanto que, *in vivo*, tais células, depois de transplantadas no rádio de ratos, foram capazes de formar osso e cartilagem, além de regenerar defeitos ósseos.

Kim, Itoh e Kotake (1997), Long (2001) e Thalmeier et al. (2001) destacaram que a medula óssea contém células com um grande potencial osteogênico, incluindo células precursoras osteogênicas. Thalmeier et al. (2001), ainda, ao verificarem a potencialidade osteoblástica das células do estroma da medula óssea,

demonstraram que as mesmas, além de uma fonte de fatores de crescimento, possuem, como parte de seu sistema de células estromais, células tronco mesenquimais. Sua progênie é capaz de se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo os precursores osteogênicos.

Sotille et al. (2002), ao realizarem um estudo *in vitro* sobre características das CMI encontradas no trabeculado ósseo humano, obtidas a partir do fêmur de pacientes com idade entre 55 e 80 anos, concluíram que a cultura dessas células, quando comparadas às células do estroma da medula óssea, apresentam total semelhança, em relação ao tempo e ao padrão de diferenciação osteogênica.

As CMI estão presentes, em pequeno número, em todos os tecidos normais, permanecendo em repouso até que, a partir de um sinal ou evento, iniciam a sua dupla capacidade de divisão celular e de auto-renovação. O resultado dessa divisão celular leva a duas células-filhas distintas, tendo uma delas a função de se proliferar produzindo progenitoras que, subseqüentemente, diferenciam-se para formar um tecido maduro. A outra célula-filha retorna ao seu estágio original de repouso até que um novo sinal ocorra. Tal característica mantém o fenótipo da célula mesenquimal indiferenciada, preservando toda a capacidade original da célula-mãe (Muschler e Midura, 2002). Os autores acrescentaram, ainda, que do período embrionário até o adulto, as células tronco, em cada órgão em desenvolvimento, vão se tornando progressivamente restritas em sua capacidade de diferenciação, ficando cada vez mais comprometidas com uma determinada função. Inicialmente, as populações de

células tronco confinadas a um seletivo grupo de tecidos (endoderma, ectoderma ou mesoderma) são multipotentes, porém, com o processo de desenvolvimento, poucas permanecem pluripotentes, capazes de se diferenciar em uma ou mais linhagens. Outras células tornam-se progressivamente limitadas, com a capacidade de gerar somente um tipo celular. Essa restrição parece ser o resultado de mudanças adaptativas críticas e irreversíveis no núcleo celular.

Katagiri e Takahashi (2002) salientaram que os osteoblastos são células especializadas que atuam diretamente sobre a formação óssea nos vertebrados. O tecido ósseo consiste, principalmente, de cristais de hidroxiapatita e vários tipos de proteínas na matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e proteoglicanos. Tanto esses cristais de hidroxiapatita quanto as proteínas são regulados pelos osteoblastos e, além disso, a alta atividade enzimática da fosfatase alcalina e a resposta a hormônios e a citocinas são características importantes dos osteoblastos.

Anselme (2000) enfatizou que a matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina, 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras), sendo todas essas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos.

Estudos de Nagai et al. (1999) mostraram que quando uma BMP é implantada em um tecido subcutâneo de ratos, as CMI são estimuladas a criar um processo similar à ossificação endocondral. No entanto, têm aumentado as evidências de que as BMPs podem induzir formação óssea diretamente, sem a seqüência endocondral. As pesquisas demonstraram que, em todos os grupos de ratos nos quais a BMP foi implantada, ocorreu ossificação intramembranosa.

Yamamoto, Furuya e Hanada (2002) observaram uma significativa resposta osteogênica com alta atividade de fosfatase alcalina, deposição de cálcio e formação de nódulos ósseos, na pesquisa *in vitro* realizada sobre o processo de diferenciação osteoblástica pela digestão enzimática e fracionada de calvária de feto de rato, que possui uma população celular rica em células osteoprogenitoras. Segundo os autores, os osteoblastos são células primárias responsáveis pela formação óssea originadas de células mesenquimais osteoprogenitoras localizadas dentro do tecido esquelético.

3.3 FATORES DE CRESCIMENTO

Solheim (1998) descreve um trabalho de Levander em 1938, no qual determinou que um extrato alcoólico de osso induzia a formação de cartilagem e de osso ectópico quando injetado intramuscular em ratos, e concluiu que a regeneração óssea ocorreu, no local, como resultado da ativação de algumas substâncias formadoras de osso, a partir de CMI.

Wozney et al. (1990) salientaram que o crescimento e a manutenção de tecido ósseo constituem um processo complexo influenciado por hormônios sistêmicos que, localmente, produzem fatores de crescimento. Além do hormônio da paratireóide, da calcitonina e da vitamina D, que são conhecidos efetores na remodelação óssea, os fatores de crescimento e transformação- β 1 (TGF- β 1), de crescimento e transformação- β 2 (TGF- β 2), de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF) e de crescimento semelhante à insulina I e insulina II (IGF-I e IGF-II) estão presentes em grande quantidade na matriz óssea. Além disso, tem sido demonstrado que essas substâncias possuem diversos efeitos no crescimento e na função de células ósseas *in vitro*.

Esses fatores de crescimento são polipeptídeos, em geral sintetizados por um tecido específico, no qual, em baixas concentrações, atuam como reguladores locais na função celular. Tais fatores de crescimento promovem a sua ativação por se ligarem a grandes receptores específicos transmembrana, na célula-alvo, a partir de uma cascata de atividades estabelecidas pela proteína quinase. Via de regra, o número de receptores ativos em uma célula diminui quando os fatores de crescimento estão presentes em excesso e aumentam quando há uma deficiência de tais substâncias. O tecido ósseo contém vários fatores de crescimento e, a partir de modernas técnicas de laboratório, incluindo a tecnologia do DNA recombinante, tem sido possível, nos últimos anos, identificar vários fatores de crescimento, incluindo BMP; IGF-I e IGF-II; TGF- β ; PDGF; e bFGF e aFGF (Solheim, 1998).

As plaquetas são fontes ricas de fatores de crescimento. Marx e Garg (2005) descrevem que esses fatores atuam através da ligação específica a um receptor de membrana. Nesse momento, uma proteína transdutora de sinal intracitoplasmática é ativada, penetra no núcleo, e ativa uma seqüência genética específica para regulação celular, síntese de colágeno, produção óssea. Os autores explicam porque a aplicação exógena de fatores de crescimento, mesmo em altas concentrações, não pode produzir aberrações como hiperplasias, tumores benignos ou mesmo malignos. Fatores de crescimento não são mutagênicos, são proteínas naturais atuando sobre a regulação genética normal e no processo normal no mecanismo de cicatrização.

3.3.1 Proteína Morfogenética Óssea (BMP)

Urist demonstrou em seu trabalho, realizado em 1965, com indução de formação óssea endocondral, que a matriz óssea desmineralizada, depois de implantada em músculo de coelho, tem condições de induzir a formação óssea ectopicamente, a partir de uma proteína de baixo peso molecular, a qual foi denominada BMP (Urist, 2002).

As BMPs são proteínas osteogênicas que têm sido isoladas de diferentes fontes, incluindo a matriz óssea desmineralizada humana, bovina, de coelhos, ratos, matriz dentinária desmineralizada e de osteossarcoma humano e de ratos.

Qualitativamente, as BMPs humanas e bovinas induzem respostas idênticas (Urist, Delange e Finerman, 1983; Muthukumaran e Reddi, 1985).

Conforme Wozney et al. (1988), com o avanço nas investigações foi possível promover a purificação da atividade osteoindutora, além do seqüenciamento e da clonagem de cada BMP. Um ano depois, o autor mostrou, em outro trabalho, o isolamento do clone de cDNA e a expressão de três proteínas recombinantes humanas, as quais chamaram de BMP-1, BMP-2A e BMP-3 sendo as duas últimas membros da superfamília do TGF- β , enquanto a primeira (BMP-1) aparece como uma nova molécula reguladora. Em 1990, Wozney et al. concluíram que, após análise da seqüência de aminoácidos da BMP humana, é possível afirmar que elas são muito semelhantes umas às outras e que formam um subgrupo da superfamília do TGF- β .

Segundo Zhou et al. (1993), muitos hormônios e fatores locais influenciam na diferenciação de osteoblastos. No entanto, as BMPs e as TGFs- β guardam um interesse particular porque são produzidas por osteoblastos, além de possuírem a habilidade, sobre certas circunstâncias, de induzir formação óssea *in vivo* por uma cascata de eventos que inicia com a proliferação das CMI e finalizam com a formação de osso.

A formação óssea normal passa por um processo prolongado, o qual é cuidadosamente regulado e está envolvido com uma seqüência de fatores de

crescimento regulados pelos osteoblastos. Embora as BMPs tenham sido originalmente descobertas em extratos de osso desmineralizado, ainda não se sabe onde esses peptídeos são produzidos no osso, por meio das células ósseas. A partir da análise da expressão do mRNA para as BMP-2, BMP-3 e BMP-4, em cultura de calvária de fetos de rato, parecem que tais BMPs podem ser produzidas por osteoblastos e armazenadas na matriz óssea (Chen et al., 1997).

Solheim (1998) descreveu que mais de 15 BMPs já foram identificadas, mas somente a BMP-1 não integra a superfamília do TGF- β .

Análises utilizando DNA recombinante têm conduzido à identificação de genes de BMPs, sendo que as proteínas sintetizadas por eles são totalmente similares em seqüência e estrutura. O seqüenciamento desses genes tem sido usado para sintetizar diferentes BMPs, chamadas de recombinantes, em culturas de células de mamífero. A formação óssea induzida pelas BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 ou BMP-7 recombinantes não se distingue da formação do osso, após implantação na matriz óssea desmineralizada induzida pela BMP parcialmente purificada de ossos humanos ou de animais. A matriz de colágeno derivada de osso representa uma via de suporte adequado para as BMPs recombinantes. O suporte de colágeno reabsorvível serve como um meio de adesão e proliferação das células mesenquimais, as quais, em resposta a uma BMPs, se diferenciam para formar novo osso (Kübler et al., 1998).

Segundo Murata et al. (1998), a diferenciação das CMI em osso e cartilagem é controlada não somente por fatores reguladores, como as BMPs, mas, também, pela interação com a matriz de suporte.

Conforme Nishimura et al. (1998), as BMPs são relacionadas à embriogênese, à organogênese e à morfogênese.

Segundo Raval et al. (1996a e 1996b), as BMPs têm sido identificadas pela sua capacidade de indução óssea, sendo verificada a ligação das mesmas com o desenvolvimento embrionário de várias células e tecidos, incluindo membros, pulmões e rins. Os membros da família das BMPs desempenham um papel importante na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células ósseas, assim como na proliferação de osteoblastos, indução de proteínas da matriz óssea e síntese de fosfatase alcalina.

Honda et al. (1997) discutiram que a TGF- β e as BMPs podem atuar organizando o início da diferenciação osteogênica, além de ser possível que sua ação local sofra influência de moduladores locais e sistêmicos. Para os autores, cada subgrupo da família de BMPs teria condições de desempenhar um papel específico no início da migração de células mesenquimais, assim com na proliferação e na diferenciação de atividades envolvendo morfogênese óssea. Além disso, sugeriram haver condições de que a ação das BMPs sobre os osteoblastos pode envolver uma

complexa regulação da expressão dos genes, incluindo aumento e diminuição da expressão do mRNA para as proteínas da família das BMPs.

Yamaguchi (1998) defendeu que as BMPs induzem diferenciação osteoblástica a partir de vários tipos celulares, incluindo CMI, células do estroma da medula óssea e pré-osteoblastos. Além disso, as BMPs não somente inibem a diferenciação miogênica, mas também convertem a diferenciação de algumas células miogênicas em linhagens de osteoblastos.

Guo et al. (1999) salientaram que as BMPs são capazes de induzir células mesenquimais a formar osso em mamíferos, com uma considerável aplicação no desenvolvimento normal do esqueleto por serem citosinas multifuncionais que regulam o crescimento, a diferenciação e a apoptose de vários tipos celulares, incluindo osteoblastos, condroblastos, células neurais e células epiteliais.

Estudando a estrutura, o mecanismo de ação, as vantagens e os recentes casos clínicos na Odontologia sobre a BMP-2 recombinante, Barboza, Caúla e Machado (1999) ressaltaram que as BMPs induzem a formação de cartilagem e osso *in vivo* por um processo complexo de múltiplos estágios envolvendo a atividade de vários fatores de crescimento locais e hormônios produzidos sistemicamente. Na opinião dos pesquisadores, o efeito mais importante observado pelas BMPs e que, na maioria dos casos, é exclusivo delas, consiste em sua capacidade de diferenciar células mesenquimais progenitoras em tipos celulares, incluindo condroblastos e

osteoblastos. As BMPs *in vitro* têm um efeito relevante nas células durante diversos estágios da formação óssea endocondral, quando comparadas à implantação de BMPs *in vivo*. Por intermédio de quimiotaxia, as BMPs podem trazer células ao local de implantação, induzir células mesenquimais progenitoras a diferenciarem-se em células formadoras de cartilagem e/ ou osso, além de influenciar na proliferação das mesmas, em vários momentos do processo de desenvolvimento.

Murata et al. (1998) defenderam que as BMPs podem induzir diretamente a formação óssea, sem depender da seqüência endocondral.

As BMPs produzem osso por meio de uma complexa série de eventos que envolvem efeitos autócrinos e parácrinos, além de uma complexa interação entre as mesmas. BMPs induzem uma cascata de eventos que comanda a ossificação endocondral e membranosa. Essas citocinas atuam promovendo a migração, a proliferação e a diferenciação de células formadoras de osso e seus precursores. Somente poucas BMPs são capazes de induzir formação óssea por si mesmas. Por exemplo, a TGF- β sozinha não é capaz de formar osso ectopicamente, mas isso pode ser possível quando em sinergismo com outras citocinas. Citocinas que não as BMPs podem facilitar a formação óssea de outras maneiras, tendo como exemplo o fator de crescimento de fibroblastos, que possui efeito angiogênico e, por conseguinte, promove a neovascularização. O PDGF, o IGF-I e IGF-II, o FGF, o fator de crescimento e diferenciação-5 (GDF-5 ou BMP-14) também são exemplos de agentes osteoindutores (Yoon e Boden, 2002).

3.4 OSTEOINDUÇÃO

Einhorn (1995) assegurou que a osteoindução é o processo que sustenta a mitogênese de CMI induzindo à formação de células osteoprogenitoras com capacidade de formar novo osso. Diferentemente de materiais osteocondutores, que servem como guia para a regeneração óssea, substâncias osteoindutoras provocam a formação óssea em locais extra-esqueletais.

De acordo com Reddi (1997), a indução óssea é caracterizada por uma seqüência de múltiplos passos, em que as fases dessa cascata são a quimiotaxia, a mitose e a diferenciação em cartilagem e/ ou osso. O autor verificou, em seu trabalho sobre o desenvolvimento ósseo endocondral, a influência das BMPs na indução óssea *in vivo* e *in vitro*. A quimiotaxia e a migração das células mesenquimais ocorrem no primeiro dia, e a proliferação (mitose), até o terceiro dia. A diferenciação em condroblastos ocorre no quinto dia e a formação de cartilagem hialina no sétimo dia. A partir do nono dia, ocorre a calcificação da matriz hipertrófica da cartilagem, e no décimo dia a angiogênese. A formação óssea inicia no décimo dia, sendo que a remodelação óssea ocorre do décimo segundo ao décimo oitavo dia e a diferenciação *in situ* da medula hematopoiética, do décimo oitavo ao vigésimo primeiro dia.

Chen et al. (1997), pesquisando o efeito osteoindutor da BMP-2 recombinante em culturas primárias de osteoblastos da calvária de fetos de ratos, observaram, durante 20 dias, que essa linhagem osteoblástica sofreu um processo de proliferação e diferenciação, tendo produzido nódulos ósseos que tinham a característica de um osso trabeculado normal.

Para Yoon e Boden (2002), a osteoindução caracteriza-se pela habilidade que algumas moléculas possuem de promover a formação óssea.

Okubo et al. (2000) defenderam que a osteoindução não depende apenas das células do hospedeiro, mas, também, da presença de CMI. A potencialidade da osteoindução vai depender da habilidade que uma certa molécula e um determinado local tem para induzir CMI a formar osso. Para os autores, a formação óssea é influenciada por muitos fatores, sendo o suprimento sangüíneo o mais importante, pois aumenta a oxigenação tecidual e, conseqüentemente, a formação de colágeno, a proliferação de fibroblastos e capilares, a atividade de osteoblastos e osteoclastos, além da formação e da mineralização do calo ósseo.

3.5 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento laboratorial de sangue autógeno. Sua estratégia terapêutica fundamenta-se na aceleração da cicatrização através da concentração dos fatores de crescimento

(Lenharo, 2001). Isto ocorre porque as células da medula óssea, presentes no material de enxerto, possuem receptores para os fatores de crescimento e a presença do PRP reduz significativamente o tempo para a maturação e consolidação do enxerto, aumentando a densidade do trabeculado ósseo (Marx et al., 1998).

Assim sendo, o PRP é uma fonte autógena de múltiplos fatores de crescimento isenta de características tóxicas ou imunorreativas e tem sido utilizado, associado aos enxertos ósseos, para acelerar os caminhos da cicatrização da ferida cirúrgica (Anitua, 1999).

A cirurgia está constantemente envolvida com os processos de regeneração e reparo tecidual. A forma, a qualidade e a rapidez desses processos são abordadas como fatores fundamentais na recuperação tanto de um paciente submetido a um procedimento de enxerto ósseo quanto de um paciente com fratura nos ossos faciais. A cirurgia não garante nem promove a cicatrização dos tecidos. O que se tenta é remover obstáculos que se interponham a essa cicatrização tais como infecções, instabilidade, corpo estranho. O PRP, devido a seus fatores de crescimento, tornou-se um acessório valioso na cicatrização tecidual na odontologia. No pós-cirúrgico, esse concentrado auxilia no início do reparo e da regeneração de tecidos moles e duros. Com isso, clínicos e cientistas começaram a pesquisar o uso do PRP em odontologia como uma forma de melhorar, ou acelerar, esse processo cicatricial. O PRP é um coágulo sangüíneo autógeno normal que contém um número altamente concentrado de plaquetas. Por ser próprio do paciente está livre de doenças

transmissivas e não há risco de reações de hipersensibilidade. O mínimo de plaquetas necessárias para ser considerado como PRP pode gerar discussões, porém uma concentração de um milhão/ μL de plaquetas, ou ainda uma contagem de 4 a 7 vezes maior que o normal para o paciente provaram ser eficientes clinicamente (Marx e Garg, 2005). Os mesmos autores relatam que em um coágulo comum há a presença de, aproximadamente, 94% de hemácias, 6% de plaquetas, e menos de 1% de leucócitos. No PRP esse valor muda, encontrando-se em média 94% de plaquetas, 5% de hemácias e 1% de leucócitos.

O remodelamento e a cicatrização de fraturas ósseas são exemplos da capacidade regenerativa do tecido ósseo graças à atuação das CMI e de sua ação progenitora (células osteoprogenitoras) (Muraglia, Cancedda e Quarto, 2000).

O organismo humano utiliza os fatores de crescimento para promover o rápido aumento do número de CMI no sítio cicatricial durante o tempo de reparo e cicatrização (Marx et al., 1998). Estes polipeptídeos são responsáveis por regular diversos eventos celulares tais como a síntese de DNA, a quimiotaxia, a citodiferenciação e a síntese de matriz (Giannobile, 1999). Também contribuem para a regeneração óssea e o incremento vascular, característica vital para a cicatrização do enxerto ósseo (Aghaloo et al., 2002), e assim parecem significar a chave para o entendimento e modulação dos processos cicatriciais (Dinato e Polido, 2001).

Tem-se teorizado que a quantidade acentuada de fatores de crescimento do PRP inicia a atividade das células ósseas indiferenciadas de forma mais completa do que ocorreria, atualmente, através da área de coagulação no enxerto (Marx, 1999; Garg, 1999). Eppley, Woodell, Higgins (2004) mostraram a quantidade de fatores de crescimento obtidos no concentrado de PRP em relação ao sangue. Concluíram que uma variedade de fatores de crescimento são detectados e liberados em níveis bem superiores no PRP. Com isso, sugeriram que o mesmo possa ser usado com grande valia na cicatrização tecidual de diversos tipos.

Carlson e Roach (2003) fizeram uma revisão da literatura sobre o uso do PRP no reparo de feridas em Odontologia, em especial em cirurgia bucomaxilofacial e periodontia. Todos os artigos revisados relataram benefícios no uso do PRP e, com isso, dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β como coadjuvante da cicatrização tecidual. O processo de obtenção do PRP tornou-se prático, com fácil uso no trans-cirúrgico, e efetivo em diversas cirurgias bucais, além de ter mostrado resultados promissores na terapia de regeneração do tecido periodontal.

Gandhi et al. (2005) realizaram um estudo em ratos diabéticos onde faziam uma fratura no fêmur e utilizavam o PRP trans-cutâneo para verificar se haveria benefício no reparo ósseo. Baseados nos resultados obtidos, os autores sugeriram que o PRP possa ser usado em casos de fraturas em pacientes com algum risco sistêmico que possa comprometer a cicatrização.

3.6 MEMBRANA DE COLÁGENO

A membrana de colágeno é um material natural (biomaterial), utilizado em regeneração óssea guiada, absorvível, que apresenta a finalidade de fornecer uma barreira mecânica para possibilitar o reparo ósseo, impedindo a interferência de fibroblastos na região. Além disso, as membranas de colágeno não necessitam re-intervenção cirúrgica e o seu tempo de absorção pode ser modulado por agentes químicos (Caiazza et al., 2000). Esses autores realizaram um estudo para avaliar a performance mecânica e a estrutura do osso neoformado ao redor de um implante de titânio através de técnicas de regeneração óssea guiada em ratos. Foram colocados dois implantes em fêmur de ratos e criados defeitos ao redor da porção superior desse implante. Os implantes do grupo teste foram recobertos por membrana de colágeno antes da sutura por planos, enquanto no grupo controle não. Os resultados radiográficos, mecânicos e histológicos mostraram que nos defeitos criados ocorreu reparo ósseo nos dois grupos, não havendo diferença estatisticamente significativa, embora com um leve favorecimento no grupo tratado com membrana de colágeno. Sugeriram, por fim, que essa barreira possa facilitar o reparo ósseo.

Em um estudo em cachorros, Tal et al. (2005) compararam a regeneração ocorrida em defeitos realizados ao redor de dentes, que incluíam a remoção de osso, cimento e ligamento periodontal. Usaram como teste osso bovino desproteinado particulado, com ou sem a adição de colágeno. No grupo controle o coágulo foi deixado se formar livremente. Todos os grupos foram divididos ainda em mais dois

subgrupos que diferiram entre si pela proteção ou não com membrana de colágeno. Os autores observaram melhor regeneração em todos os grupos em que a barreira com membrana de colágeno foi mantida.

Ozmeriç et al. (2000) realizaram também um estudo em cachorro, criando um defeito ósseo em duas paredes ao redor de dentes mandibulares. No grupo teste, foi colocada barreira com membrana de colágeno entre o dente e o defeito, enquanto o grupo controle não recebeu a membrana. As amostras foram analisadas aos 30, 60, e 90 dias pós-operatórios, e os dados analisados por histomorfometria. O ganho ósseo e periodontal, assim como a recessão gengival, foi semelhante nos dois grupos. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

Os defeitos intra-ósseos apresentam um grande desafio na periodontia, pois sua regeneração é difícil. Sculean et al. (2005) realizaram um estudo em humanos comparando áreas de defeito intra-ósseo tratados com osso bovino liofilizado e recoberto com membrana de colágeno com a técnica de retalho periodontal. Os resultados mostraram diferença significativa no nível clínico de inserção periodontal, mostrando que o emprego do osso liofilizado associado à membrana de colágeno é útil no tratamento desse tipo de defeito.

3.7 ARCABOUÇO DE ÁCIDO POLIGLICÓLICO POLILÁTICO

O arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA) é um material flexível, absorvível em até 6 meses, projetado para estimular o crescimento de tecido ósseo, especialmente indicado para periodontia. Promove um suporte físico para o crescimento de novo tecido. Recentemente as culturas de células em arcabouços de PLGA resultaram em desenvolvimento de substitutos ósseos e de cartilagem. Embora o PLGA parece ser indicado para engenharia tecidual, a sua resistência mecânica, poros de tamanhos reduzidos e superfície com propriedades hidrofóbicas limitam seu uso. O tratamento de superfície de um arcabouço é um importante método para atingir características de superfície para a adesão e proliferação de células. PLGA tem sido usado como arcabouço para engenharia tecidual devido a suas propriedades físicas favoráveis. Entretanto, a superfície química do PLGA não promove uma adequada adesão e proliferação celular devido a sua natureza hidrofóbica (Lee et al., 2002).

Wu et al. (2006) avaliaram diferentes tratamentos de superfície para os arcabouços de PLGA. Encontraram que o tratamento de superfície com biomateriais naturais aumentam significativamente a propriedade hidrofílica do material. O tratamento com quitosan (copolímero de glicosamida e N-acetilglicosamida, de origem de exoesqueleto de insetos e invertebrados marinhos), preveniu a rápida degradação do material, que poderia ser esperada pela a liberação de ácidos, através da neutralização do pH pela liberação de aminoácidos básicos.

Para melhorar a capacidade de adesão celular ao arcabouço de PLGA, Lee et al. (2006) adicionaram matriz de colágeno, derivada de porção submucosa da bexiga, à estrutura, devido a capacidade de adesão e proliferação celular ao colágeno. Relataram que esse compósito é hidrofílico e que possui poros com interconectividade por todo o arcabouço, que resulta em fácil adesão e proliferação celular.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi idealizado de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do Conselho Nacional de Saúde (CNS) – Resolução n. 01 de 13 de junho de 1988 e em observância da lei 6638, de 08 de maio de 1979. Foi aprovado pelo Comitê Científico e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS (Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Anexo C).

4.2 HIPÓTESES

H1- As células mesenquimais da medula óssea humana aderem e diferenciam-se em osteoblastos sobre membrana de colágeno bovino e sobre membrana de PLGA *in vitro*;

H2- O uso da BMP acelera a diferenciação celular;

H3- O uso de PRP acelera a diferenciação e proliferação celular;

H4- A associação entre rhBMP-4 e PRP acelera a diferenciação e reprodução celular.

4.3 AMOSTRA

4.3.1 Obtenção das células mesenquimais indiferenciadas

As células mesenquimais indiferenciadas empregadas neste estudo foram obtidas a partir da medula óssea do ílaco de um doador humano submetido à cirurgia de enxerto ósseo, para posterior reabilitação bucal com prótese sobre implantes osseointegrados. Este procedimento não acarretou dano extra ao paciente, o qual assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

No momento da cirurgia, o sangue da medula óssea foi aspirado com duas seringas de 20 mL acopladas a uma agulha trocarter. Após, o material foi transferido para um tubo estéril e armazenado em banho de gelo até a separação em gradiente de densidade (Figura 1).

As células foram separadas, por centrifugação, em gradiente de densidade usando Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics, USA). Para tanto, as células foram re-suspensas com um volume igual ao de medula com meio de cultura D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*; Invitrogen, USA), colocadas sobre ½ do volume de Histopaque® e centrifugadas (MSE Mistral 2000, USA) a 400 g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 50 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) e centrifugada a

1.500 rpm, por 3 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul-tripan em hemocítômetro (Optik Labor, USA) e as células re-suspensas a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/ mL.

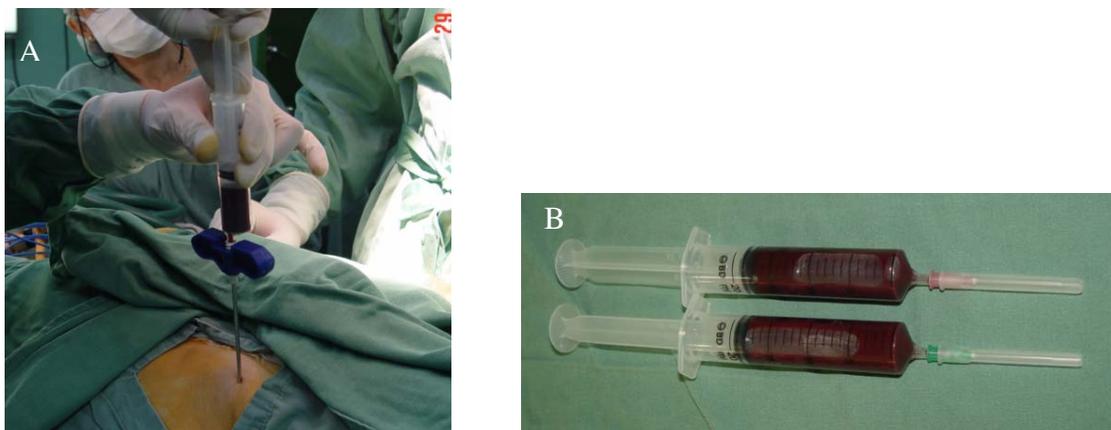


Figura 1- A. Punção para a aspiração da medula óssea da crista do íliaco. B. Seringas contendo aproximadamente 30 mL de sangue da medula óssea.

4.3.2 Preparo da Membrana de Colágeno e do Arcabouço de PLGA

As membranas de colágeno (Baumer), 4 no total, originalmente mediam 20mm^2 e foram uniformemente recortadas em 16 porções medindo, então, $5\text{mm} \times 5\text{mm}$.

Os arcabouços de ácido poliglicólico e polilático (PLGA) (Surgitime Expanded, Bionnovation, Bauru, Brasil), 4 no total, mediam originalmente 20mm^3 . Foram divididos em 16 pedaços medindo 5mm^3 .

4.3.3 Preparo do Plasma Rico em Plaquetas

Foram coletados 30 mL de sangue periférico do paciente, distribuídos em 6 tubos “vacutainer” de 5 mL, cada um contendo 0,5 mL o anticoagulante citrato de trissódio a 10%. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm, por 6 minutos, a uma força de 160 g, protocolo esse estabelecido por Chaves Jr. (2003) e utilizado como padrão pelo Serviço de CTBMF do Hospital São Lucas da PUCRS. Após a centrifugação, 1 mL de PRP foi aspirado com pipetador calibrado de cada tubo “vacutainer” e colocado em um frasco estéril. Adicionou-se cloreto de cálcio à 10%, numa proporção de 10/1, a fim de ativar o PRP. Aguardou-se a coagulação do concentrado e aplicou-se 1/16 em cada poço de cultura.

4.3.4 Composição da Amostra:

A amostra se dividiu em dois grupos (A e B), os quais se dividiram em 4 subgrupos (1, 2, 3, 4). Foram avaliadas 2 membranas ou arcabouços de cada subgrupo aos 6, 9, 14 e 21 dias.

Grupo A

A1- Composto por CMI com o uso da rhBMP-4 sobre um arcabouço de PLGA.

A2- Composto por CMI com o uso da rhBMP-4 e do PRP sobre um arcabouço de PLGA.

A3- Composto por CMI com o uso do PRP sobre um arcabouço de PLGA.

A4- Composto por CMI sobre um arcabouço de PLGA, sendo este o grupo controle.

Grupo B

B1- Composto por CMI com o uso da rhBMP-4 sobre uma membrana de colágeno.

B2- Composto por CMI com o uso da rhBMP-4 e do PRP sobre uma membrana de colágeno.

B3- Composto por CMI com o uso do PRP sobre uma membrana de colágeno.

B4- Composto por CMI sobre uma membrana de colágeno, sendo este o grupo controle.

Foi ainda mantido um poço cultura, para cada dia de avaliação, contendo apenas CMI, classificado como C6, C9, C14, C21.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Uma alíquota da preparação foi usada para citometria de fluxo. Para a caracterização das populações celulares presentes na suspensão de células foi realizada pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos marcados com fluoróforos compatíveis para análise em duplas. Para tanto, empregou-se o anticorpo anti-CD34 marcado com fluoresceína (FITC) e anti-CD117 (c-kit) marcado com ficoeritrina (PE) em uma análise e na outra, anticorpo anti-CD45 marcado com ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5) e CD105 marcado com ficoeritrina (PE), além do tubo com células sem marcação e controle de isotipo (IgG-PE, IgG-FITC). As suspensões foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) em uma alíquota de 100 μ l de suspensão celular onde foram acrescentados 5 μ L de cada anticorpo e a solução foi incubada a 4°C por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 200 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi lavada com 3 mL de PBS (PBS, 0,1% de azida sódica e 1% de FBS) por centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspensas com 1 mL de 3,7% de paraformaldeído em PBS. As amostras foram analisadas no dia seguinte à preparação.

4.5 CULTURA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA SOBRE OS SUPORTES

As CMI foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (500 μ L de suspensão celular/ poço) contendo a membrana de colágeno ou PLGA a 37°C por 24 horas, em estufa contendo 5% de CO₂, em meio D-MEM suplementado com 10% de

soro fetal bovino (FBS, Invitrogen, USA) inativado durante 30 minutos a 56°C, 1% de uma solução de estreptomicina-penicilina (10.000 g/ mL, 10.000 U/ mL, Invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina (10 mg/ mL, Invitrogen, USA). Nos grupos onde as células foram cultivadas na presença de rhBMP-4 esta foi adicionada ao meio de cultura a uma concentração de 40 ng/ mL.

4.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR SOBRE A MEMBRANA DE COLÁGENO BOVINO E O ARCABOUÇO DE PLGA

Para análise da proliferação celular das células mesenquimais, a membrana de colágeno bovino e a membrana de PLGA foram removidas após 6, 9, 14, e 21 dias de cultura. As células tiveram seus núcleos corados com o agente intercalante de DNA, Iodeto de Propídio. Para isso, após a remoção do meio de cultura, as membranas foram lavadas com DPBS por duas vezes e coberta com 200µl de Iodeto de Propídio por 10 minutos. As membranas foram colocadas em uma lâmina para análise e observação das células em microscópio óptico sob luz ultravioleta (Axiolab, Zeiss, Alemanha).

Igualmente, a membrana de colágeno e o suporte de PLGA foram fixados em formol tamponado a 10%. Posteriormente, foram incluídos em parafina e para subsequente processo laboratorial de confecção das lâminas histológicas, e coradas com hematoxilina-eosina (HE) no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São

Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Secções de 4 μm de espessura foram obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com 10% de poli-L-lisina (Sigma, USA) e levados a estufa a 60°C por 24 horas. Os cortes foram desparafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) de Harris por 15 segundos. Após lavagem em três banhos de água, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de amônia 37 mM. Após a contra-coloração, a lâminas foram lavadas em três banhos de água morna, seguido de desidratação em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e puro, respectivamente) por 3 minutos em cada diluição. Após dois tratamentos por 5 minutos em xileno, os cortes foram cobertos com lamínulas montadas em Entellan[®] (Merck, Alemanha). As amostras foram analisadas em microscópio de luz direta (Axiolab, Zeiss, Alemanha).

4.7 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RT-PCR

4.7.1 Extração de Ácido Ribonucléico (RNA) e purificação do RNA mensageiro (mRNA)

A expressão do mRNA para as proteínas osteocalcina e osteopontina pelas células cultivadas na membrana de colágeno bovino e PLGA foi detectada pela extração do RNA total seguido de uma reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma dessas proteínas.

As membranas (colágeno e PLGA) foram retiradas das placas de cultura e lavadas em PBS. A seguir foram incubadas com 100 μ L de solução de tripsina/EDTA 5,3 mM (Invitrogen, USA), em tubo Eppendorf, durante 5 minutos em estufa à 37°C com 5% de CO₂. A seguir os tubos foram agitados e as membranas foram removidas. A amostra foi centrifugada a 8000 rpm, por 10 segundos, e o sobrenadante descartado. As células foram re-suspensas com 100 μ L de RNA holder (Bioagney, Brasil), mantidas por 18 horas à 4°C e finalmente armazenadas à -20°C até a extração do RNA total.

Para a extração do RNA total, 100 μ L de PBS foram adicionados aos tubos para diluir o RNA holder e as amostras foram centrifugadas a 14 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com uma solução de TRIZOL Reagent (Invitrogen, USA). As células foram lavadas uma vez com 1 mL de DPBS. Após, foram adicionados 100 μ L de DPBS e 400 μ L de TRIZOL Reagent e incubadas, por 5 minutos, à temperatura ambiente para destruição das membranas celular e nuclear e liberação dos ácidos nucléicos. Após o período de incubação, as suspensões foram retiradas da placa de cultura e transferidas para um tubo

Eppendorf seguida da adição de 80 µL/ tubo de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos, incubadas, por 10 minutos, à temperatura ambiente, e centrifugadas (Eppendorf 5417R, USA) a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico gelado e incubados por, pelo menos, duas horas, à -20°C. As amostras foram centrifugadas, por 10 minutos, nas mesmas condições. Os precipitados foram lavados com 500 µL de etanol 75%, gelado, e centrifugados a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e os tubos permaneceram à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos para secar o precipitado. Uma vez secos, os RNAs foram solubilizados com 20 µL de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC 0,1%, Invitrogen, USA) contendo 1 µL de inibidor de RNase (40 U/ µL; Invitrogen, USA).

Para evitar uma possível contaminação com DNA na extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras foram tratadas com a enzima Deoxirribonuclease I (DNase I 124 U/ µL, Invitrogen, USA), a qual cliva o DNA de fitas simples e dupla que contém extremidades 5 fosfato. Assim, os 20 µL de cada extração de RNA total foram digeridos com 10 U da enzima em um volume final de 22 µL. As amostras foram incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a enzima foi inativada pela adição de 1 µL de 25 mM de EDTA e incubadas, por 10 minutos, a 65°C.

4.7.2 Transcrição Reversa para obtenção dos cDNAs

Uma vez obtido o RNA total das células e tratado com a DNase I, procedeu-se a uma reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), utilizando-se a enzima Superscript II e os oligonucleotídeos iniciadores oligos-dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA). Para cada reação utilizou-se 22 µL da extração de RNA total, 0,5 µL da enzima Superscript II (200 U/ µL; Invitrogen, USA), 0,2 µL de oligos-dT₁₂₋₁₈, 4,5 µL de DTT (0,1M; Invitrogen, USA), 4,5 µL de dNTPS (100 mM; Invitrogen, USA), 4,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 9 µL de tampão da enzima (5x; Invitrogen, USA), e H₂O-MQ até completar 45 µL de solução de reação. As reações foram incubadas no termociclador (Peltier Thermocycler, MJ Research, USA) e submetidas ao seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C, e 3 minutos a 99°C, em um termociclador. Após o término da transcrição reversa foram adicionados a cada tubo 5 U de ribonuclease H (2 U/ µL; Invitrogen, USA) e as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até o uso para a reação da PCR.

4.7.3 Quantificação da expressão do gene β -actina pela técnica de PCR em tempo real

O gene β -actina, por ser um gene constitutivo, tem sido amplamente utilizado como controle da extração de RNA e da síntese da primeira fita de cDNA. Assim, todas as amostras são avaliadas para a expressão desse gene. Caso sua expressão

não seja detectada, significa que houve perda de RNAs durante o procedimento e/ou armazenamento, o que leva ao descarte da amostra. O fato da amostra ser positiva para o gene de β -actina e negativo para qualquer outro gene de interesse, no caso osteopontina e osteocalcina, significa que o mesmo não está sendo expresso.

O produto da PCR para a β -actina é um fragmento de 390 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5' CCT CAT GAA GAT CTT CAC 3' e reverso 5' GCT TGTAGC TCT TCT CCA 3'.

4.7.4 Quantificação da expressão dos genes de Osteopontina e Osteocalcina pela técnica de PCR em tempo real

O produto da PCR para a osteopontina é um fragmento de 313 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5' CAT CTC AGA AGC AGA ATC TCC 3' e reverso 5' CCA TAA ACC ACA CTA TCA CCT C 3'. O produto da PCR para a osteocalcina é um fragmento de 405 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores direto 5' CGC AGC CAC CGA GAC ACC AT 3' e reverso 5' GGG CAA GGG CAA GGG GAA GA 3'.

A Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real foi realizada em termociclador específico (iCycler, Bio-Rad Laboratories, Sadtler Division, USA) com a adição dos seguintes reagentes em um volume total de 25 μ l para cada amostra: 12,5

μl do Platinum[®] SYBR[®] Green (Invitrogen[®] Life Technologies, Carlsbad, USA); 2,5 μl de cada oligonucleotídeo iniciador (direto e reverso), 2,5 μl dos cDNAs obtidos previamente e 5 μl de água MilliQ.

O Platinum[®] SYBR[®] Green possui os seguintes componentes: Fluoróforo SYBR[®] Green I; Taq DNA Polimerase (60 U/ mL); Tris HCl (40 mM); KCl (100 mM); MgCl₂ (6 mM); dATP, dCTP, dGTP e dUTP (400 μM); UDG (40 U/ mL); Estabilizantes.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: Ciclo 1: 95 °C (3 min); Ciclo 2: 30 repetições de 95 °C (10 s) e 42 °C (1 min); Ciclo 3: 95 °C (1 min); Ciclo 4: 42 °C (1 min); Ciclo 5: incrementos de 1 °C na temperatura a cada 10 s, a partir de 42 °C até 100 °C; Ciclo 6: manutenção das amostras a 4 °C.

4.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Osteopontina e Osteocalcina

Foi realizado também a expressão das proteínas osteopontina e osteocalcina em PCR convencional.

A mistura da reação continha 0,5 μL do cDNA correspondente a cada amostra, tampão 10x de concentração, 100 μM de dNTPs, 2,5U de Taq DNA polimerase, 25pmol de cada *primer* e concentração MgCl₂ de 2,0mM. A reação de PCR foi realizada em termociclador nas seguintes condições: um ciclo inicial a 94 °C durante cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos

e 72°C por um minuto (desnaturação, anelamento, e extensão). Um ciclo final a 72°C por dez minutos foi empregado para a extensão final dos amplicons.

Os produtos da PCR foram misturados a uma solução de azul de bromofenol, glicerol, e água (tampão6x) e submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo Brometo de Etídio (EtBr), com tampão TAE 1x e, após, visualizados sob luz ultravioleta.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

As lâminas histológicas foram analisadas descritivamente, de forma observacional, a fim de avaliar em quais grupos experimentais ocorreram adesão e proliferação das CMI as estruturas de suporte.

Foi também realizada uma análise descritiva do grau de diferenciação celular nos períodos de tempo analisados nesta pesquisa, através dos transcritos para osteocalcina e osteopontina.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CITOMETRIA DE FLUXO

As populações celulares presentes na suspensão de células foram caracterizadas pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos marcados com fluoróforos compatíveis para análise em duplas.

As células coletadas da medula óssea utilizadas neste estudo apresentavam-se a seguinte distribuição: 4,35% CD34⁺, 9,75% CD117⁺, 65,5% CD34⁺/CD117⁺, 11,5% CD45⁺, 15,35% CD105⁺ e 30,5% CD45⁺/CD115⁺.

5.2 ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células da medula óssea humana foram avaliadas após cultura *in vitro* na presença de rhBMP-4 e/ ou PRP sobre uma membrana de colágeno ou de membrana de PLGA, em relação aos seus aspectos morfológicos e proliferativos, nos períodos experimentais de 6, 9, 14 e 21 dias.

Foram realizadas avaliações microscópicas das membranas, observadas em microscópio ótico, sobre luz ultravioleta e coradas com iodeto de propídio.

A amostra controle de 14 dias com arcabouço de PLGA não foi possível analisar com esta coloração.

Tabela 1- Distribuição dos subgrupos em relação ao dia de análise, quando corados com Iodeto de Propídio.

Subgrupo	Dias de Cultura			
	6	9	14	21
A1	X	√	√	√
A2	√	√	√	√
A3	√	√	√	√
A4	X	∅	√	X
B1	X	√	√	√
B2	√	√	√	√
B3	X	√	√	√
B4	X	X	√	√

Legenda: X mostra os subgrupos nos quais não se visualizaram núcleos marcados. √ mostra os subgrupos nos quais houve presença de núcleos marcados. ∅ representa o subgrupo em que não se obteve a amostra.

5.2.1 Período 6 dias

Não houve marcação nuclear nos subgrupos A1, A4, B1, B3, B4 (figuras 2, 5, 6, 8 e 9, respectivamente). Foi possível observar presença de núcleos marcados nos subgrupos A2; A3; B2, como mostram as figuras 3, 4 e 7, respectivamente.



Figura 2. Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA no sexto dia de cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença núcleos marcados. Aumento 10x.

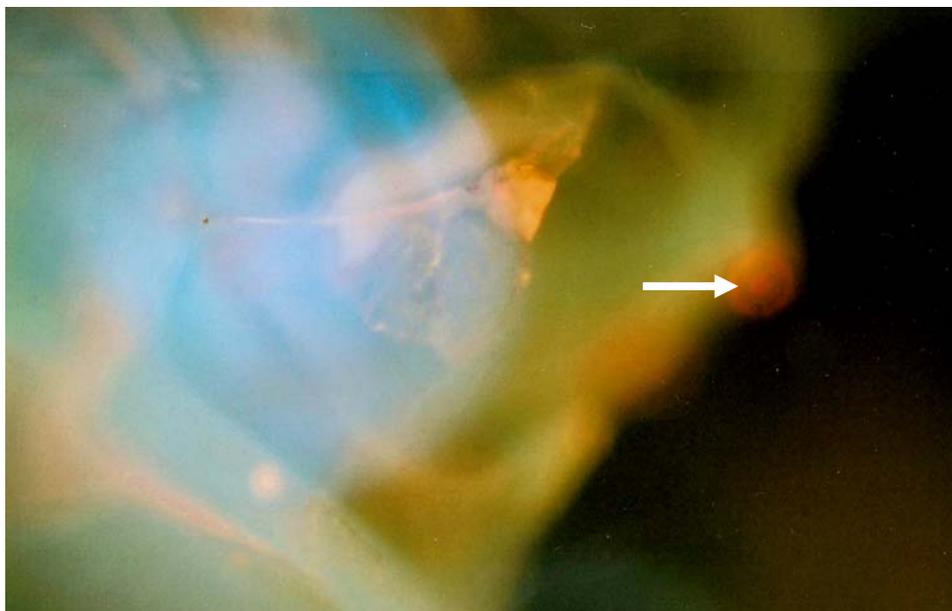


Figura 3. Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA no sexto dia de cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. A seta aponta um núcleo marcado (seta). Aumento 10x.

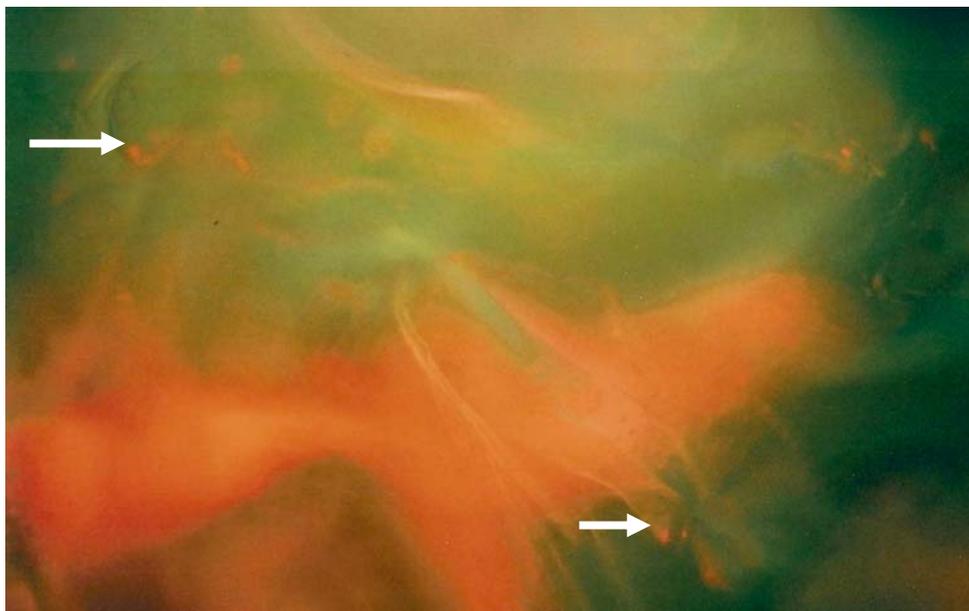


Figura 4. Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (setas). Aumento 10x.



Figura 5. Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura, sem adição de rhBMP-4 ou PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

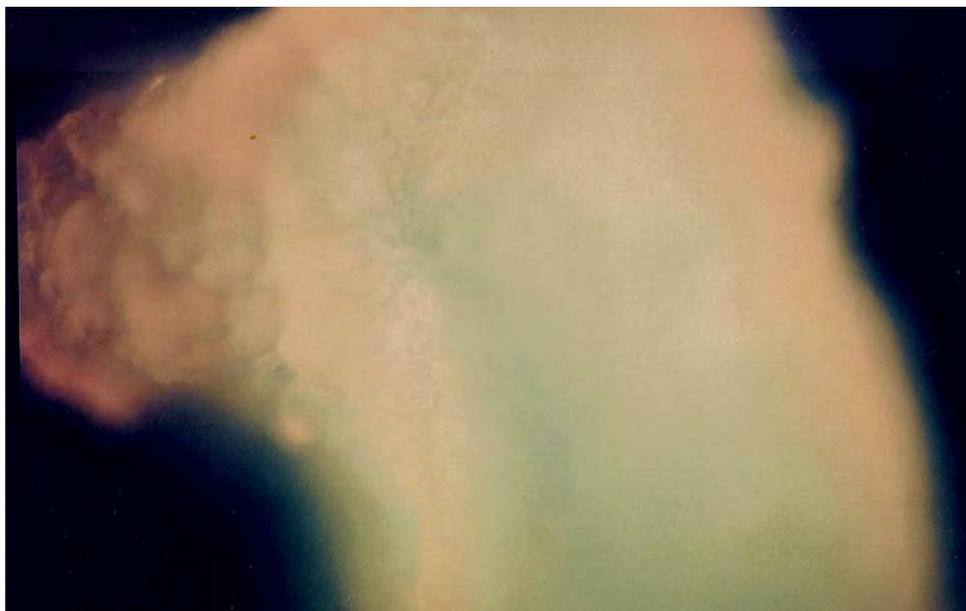


Figura 6. Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

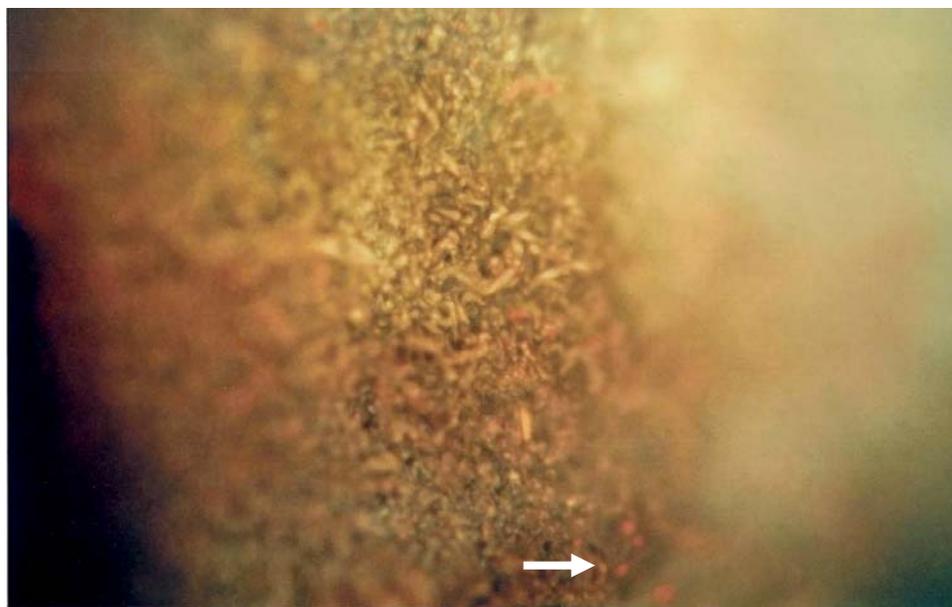


Figura 7. Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (setas). Aumento 10x.

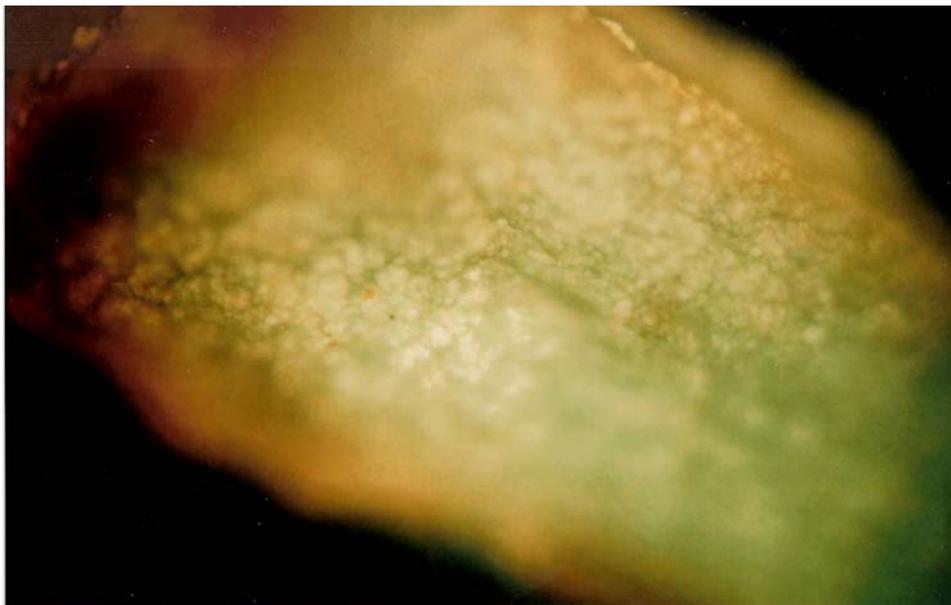


Figura 8. Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

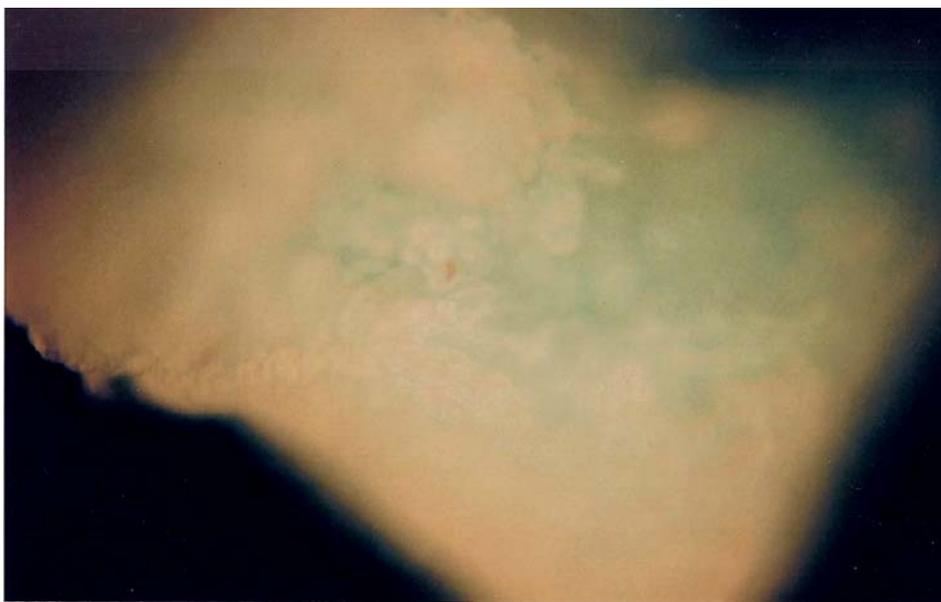


Figura 9. Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

5.2.2 Período 9 dias

Após nove dias de cultura não foi observada marcação nuclear no subgrupo B4 (figura 16), entretanto detectou-se a presença de núcleos marcados nos subgrupos A1; A2; A3; B1; B2; B3 (figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, respectivamente).

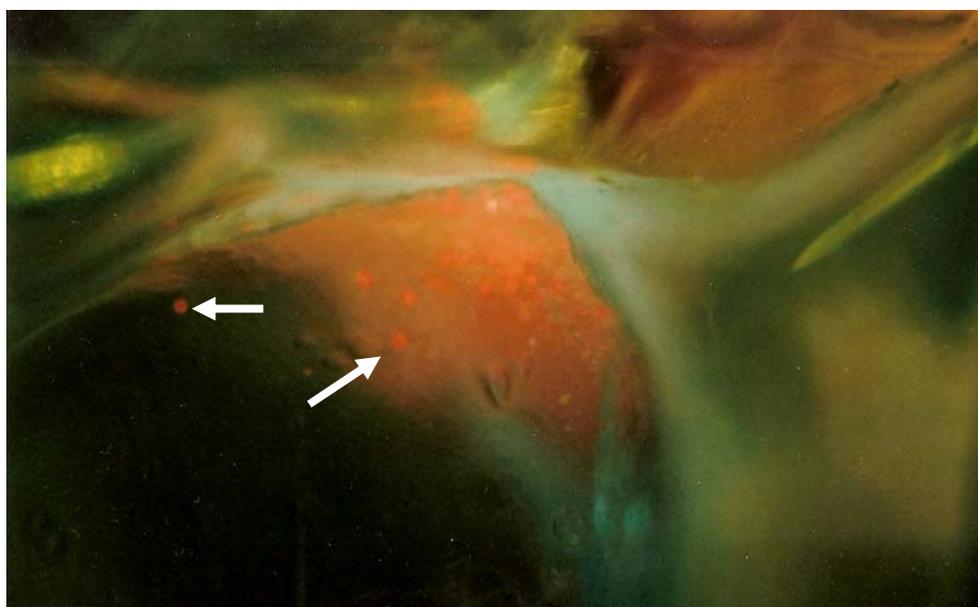


Figura 10. Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

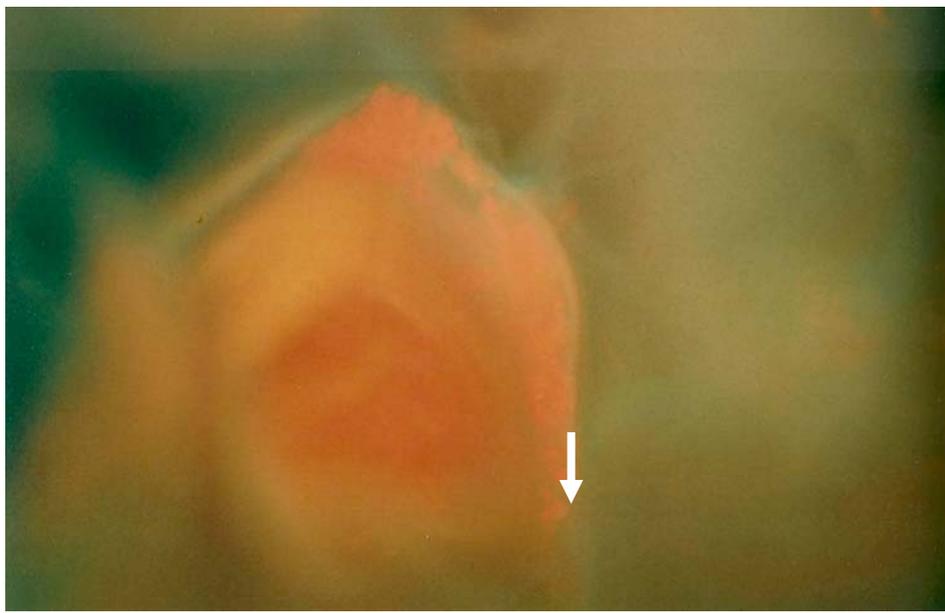


Figura 11. Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

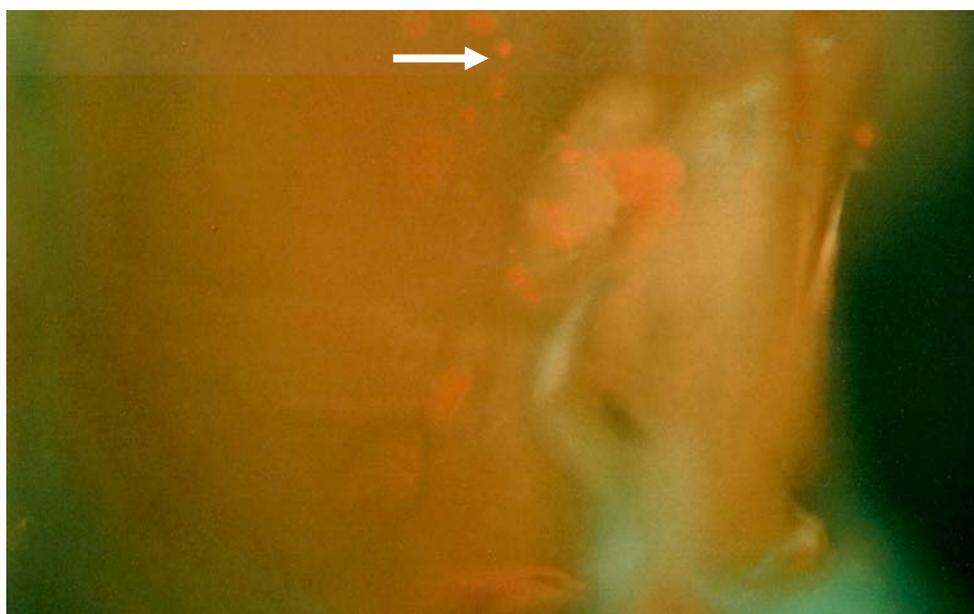


Figura 12. Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

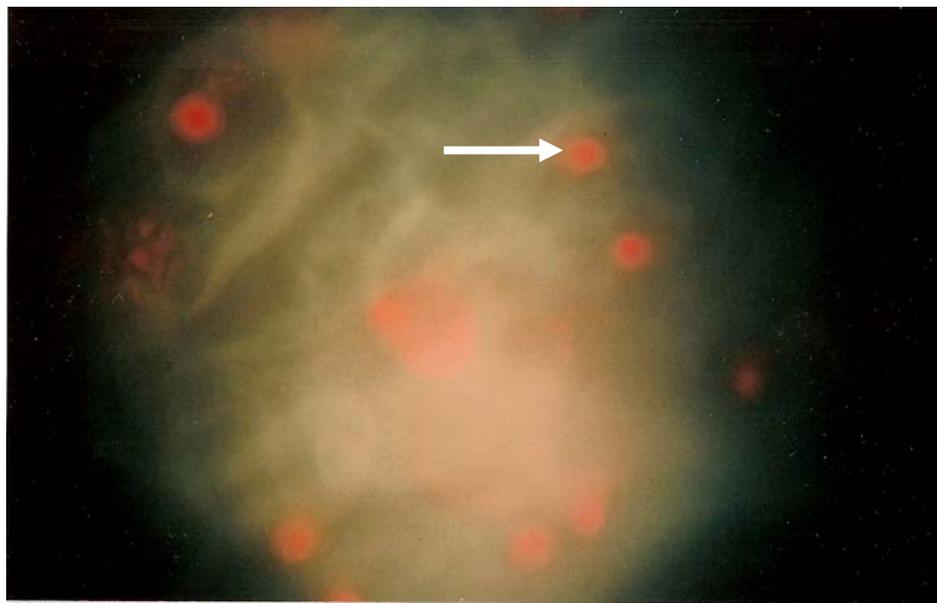


Figura 13. Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados. Aumento 40x.



Figura 14. Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

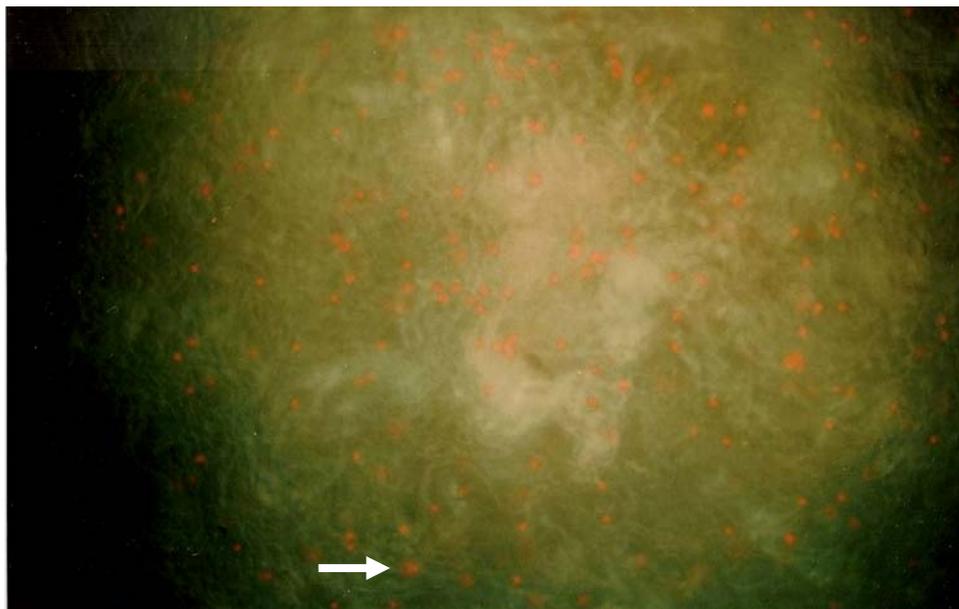


Figura 15. Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.



Figura 16. Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

5.2.3 Período 14 dias

Todos os grupos avaliados apresentaram núcleos marcados com iodeto de Propídio, após 14 dias de cultura, como mostram as figuras 17 à 24.

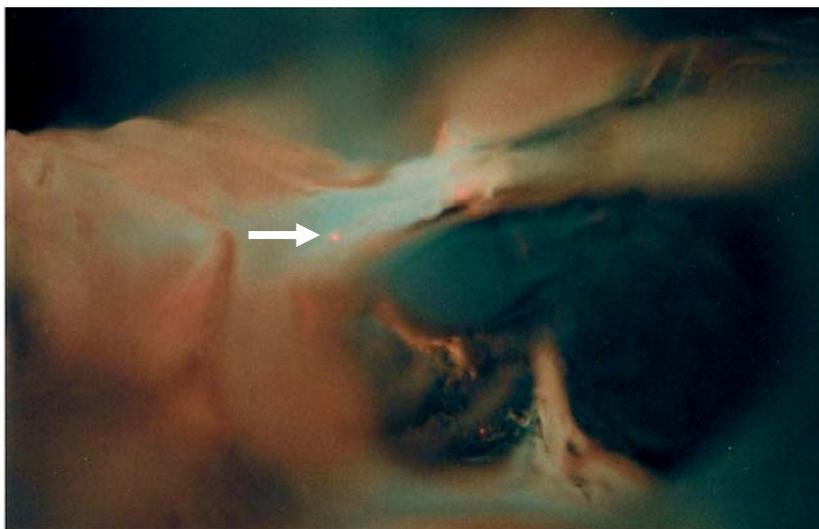


Figura 17. Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de iodeto de Propídio. Nota-se a presença de poucos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

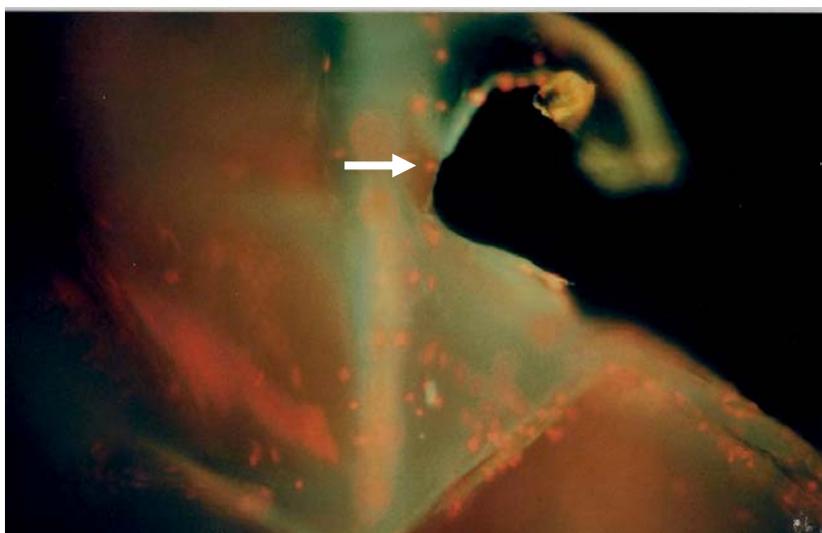


Figura 18. Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e gel de PRP) marcado com iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados. Aumento 10x.

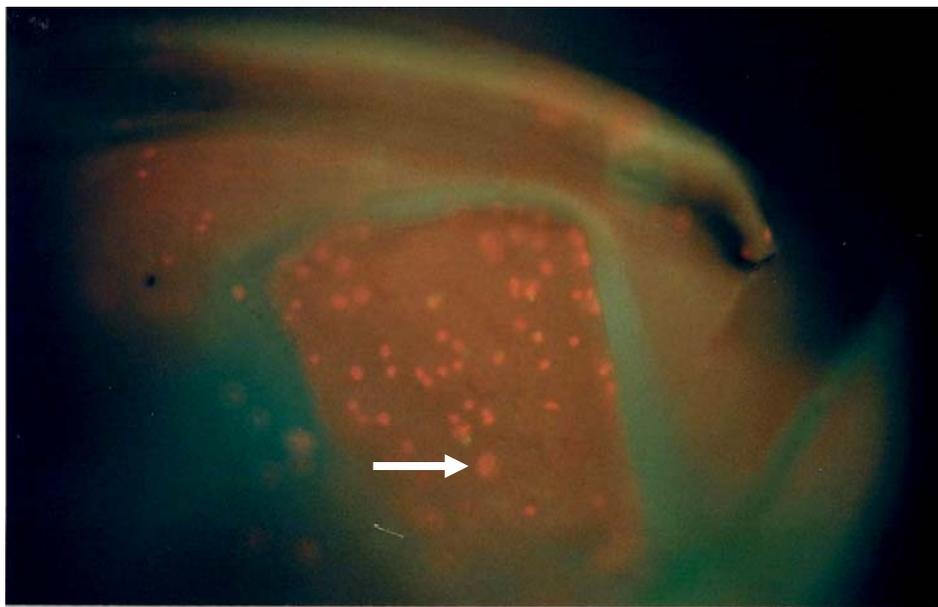


Figura 19. Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

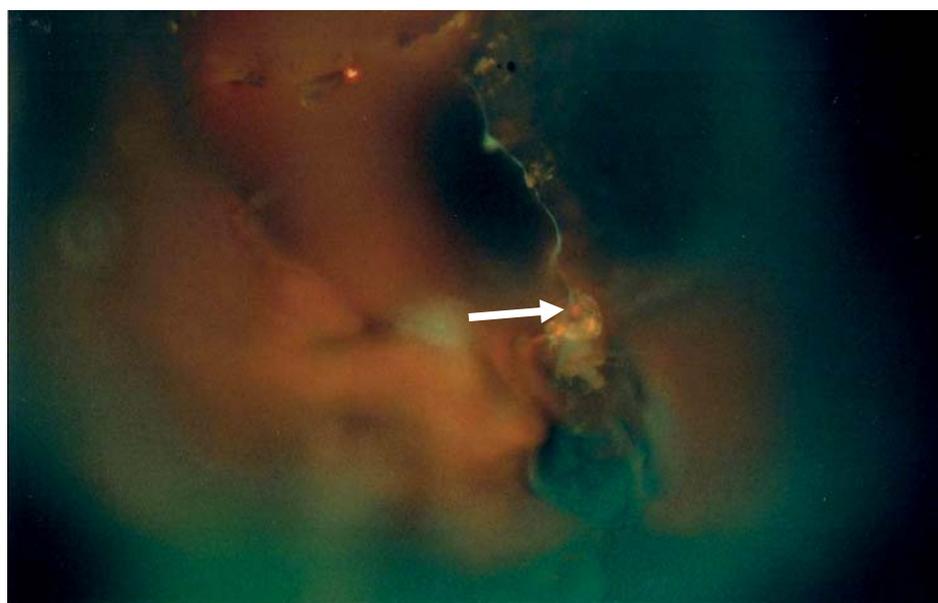


Figura 20. Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura controle) marcado com Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de poucos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

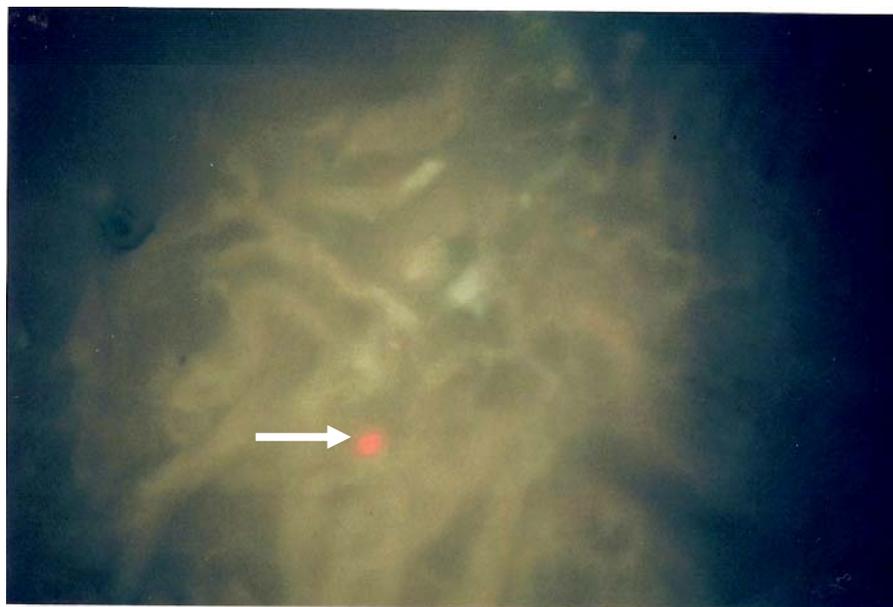


Figura 21. Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de um núcleo marcado (seta). Aumento 40x.

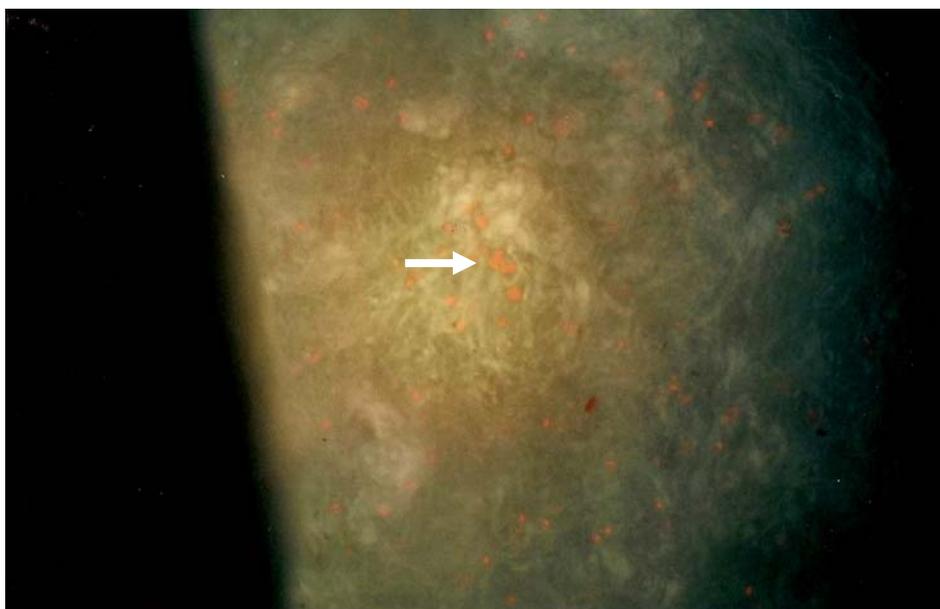


Figura 22. Fotomicrografia do subgrupo B2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

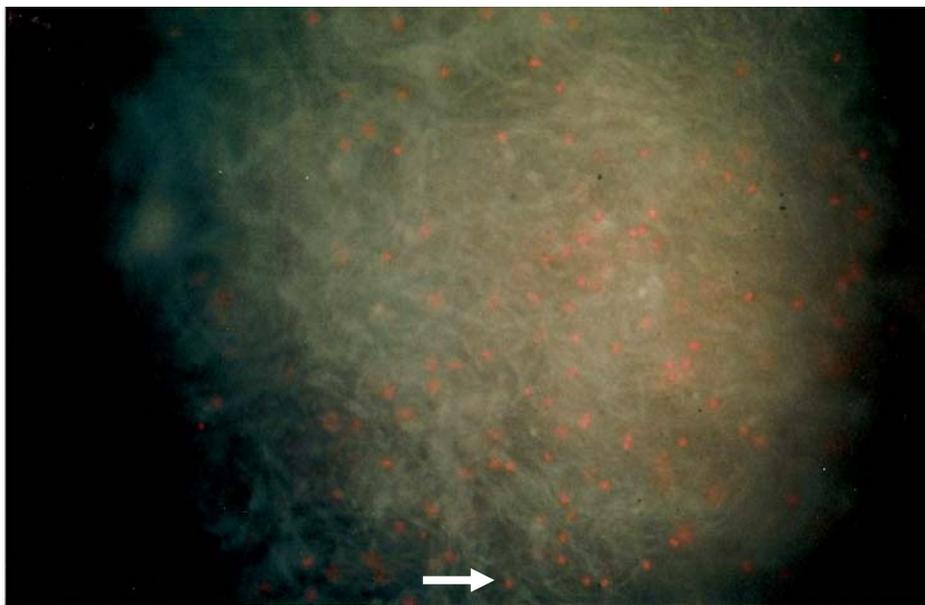


Figura 23. Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com gel de PRP) marcado com Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

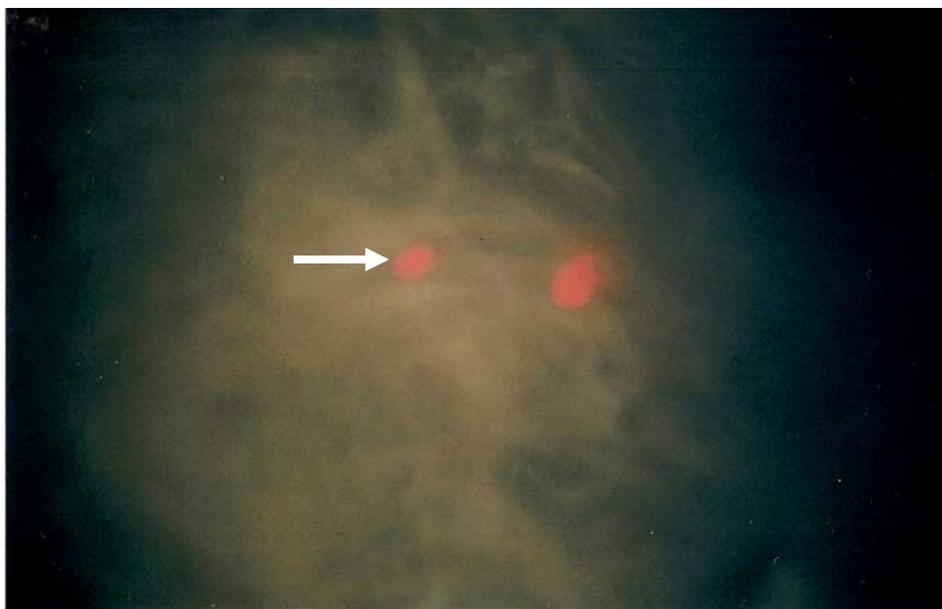


Figura 24. Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura) com marcador de Iodeto de Propídio. Notam-se a presença de dois núcleos marcados. Aumento 40x.

5.2.4 Período 21 dias

Não houve marcação nuclear no subgrupo A4 (figura 28). A presença de núcleos marcados foi detectada, após 21 dias de cultura, nos grupos A1, A2, A, B1, B2, B3 e B4 (figuras 25 à 27 e 29-32)

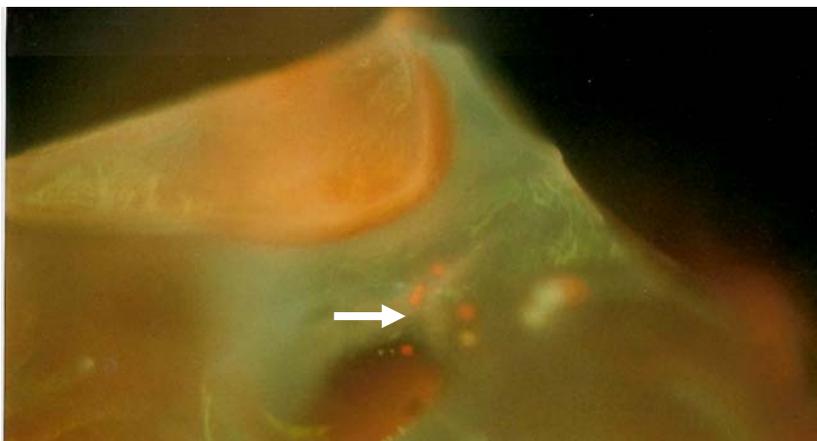


Figura 25. Fotomicrografia do subgrupo A1 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídeo. Nota-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

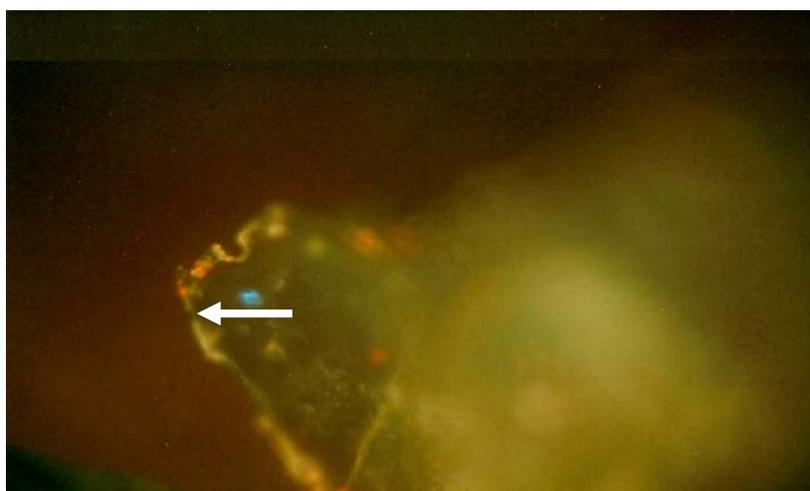


Figura 26. Fotomicrografia do subgrupo A2 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídeo. Nota-se a presença de alguns núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

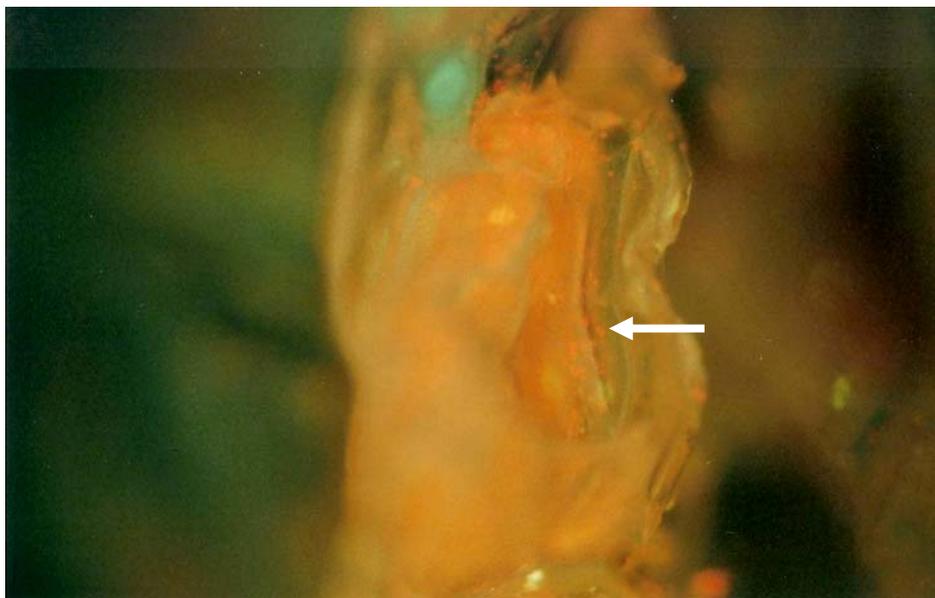


Figura 27. Fotomicrografia do subgrupo A3 (arcabouço de PLGA em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a diminuição de núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

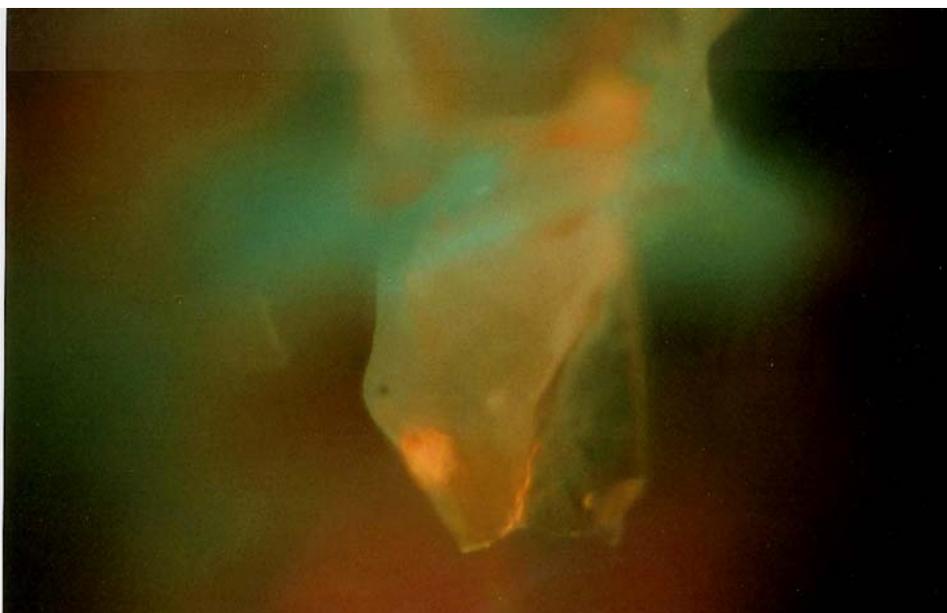


Figura 28. Fotomicrografia do subgrupo A4 (arcabouço de PLGA em cultura, sem adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Não se observa a presença de núcleos marcados. Aumento 10x.

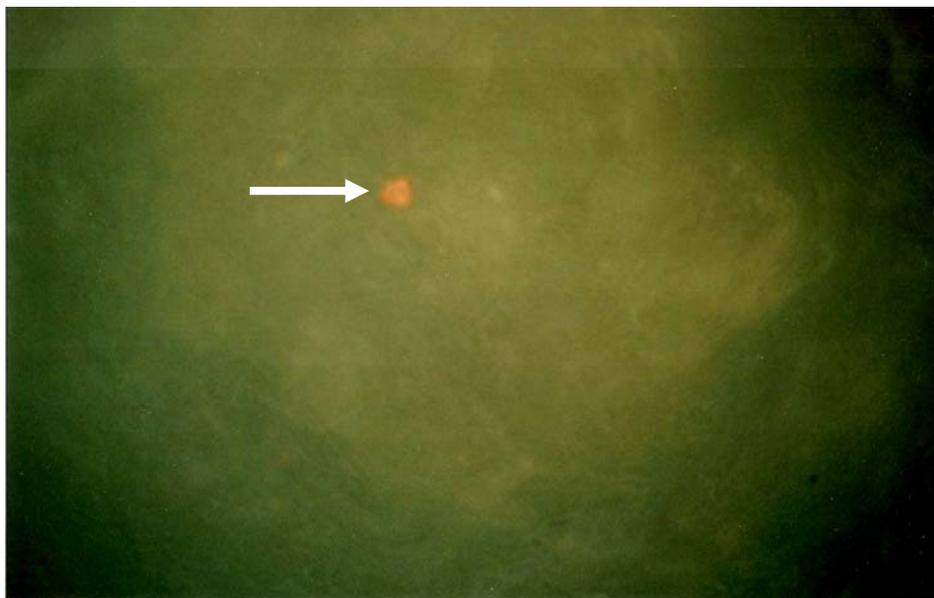


Figura 29. Fotomicrografia do subgrupo B1 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4) com marcador de Iodeto de Propídio. Nota-se a presença de um núcleo marcado (seta). Aumento 40x.



Figura 30. Fotomicrografia do subgrupoB2 (membrana de colágeno em cultura com rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 40x.

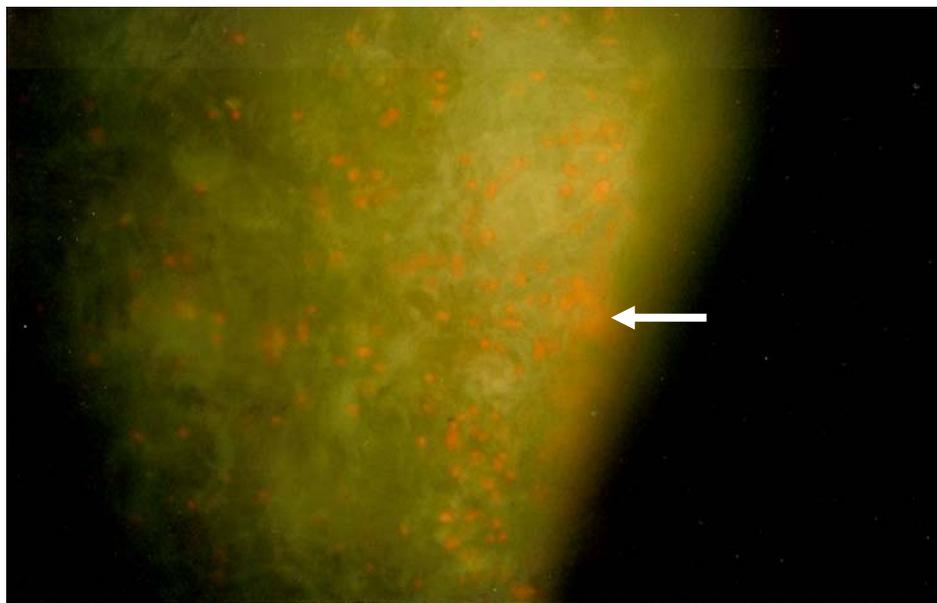


Figura 31. Fotomicrografia do subgrupo B3 (membrana de colágeno em cultura com PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observam-se a presença de muitos núcleos marcados (seta). Aumento 10x.

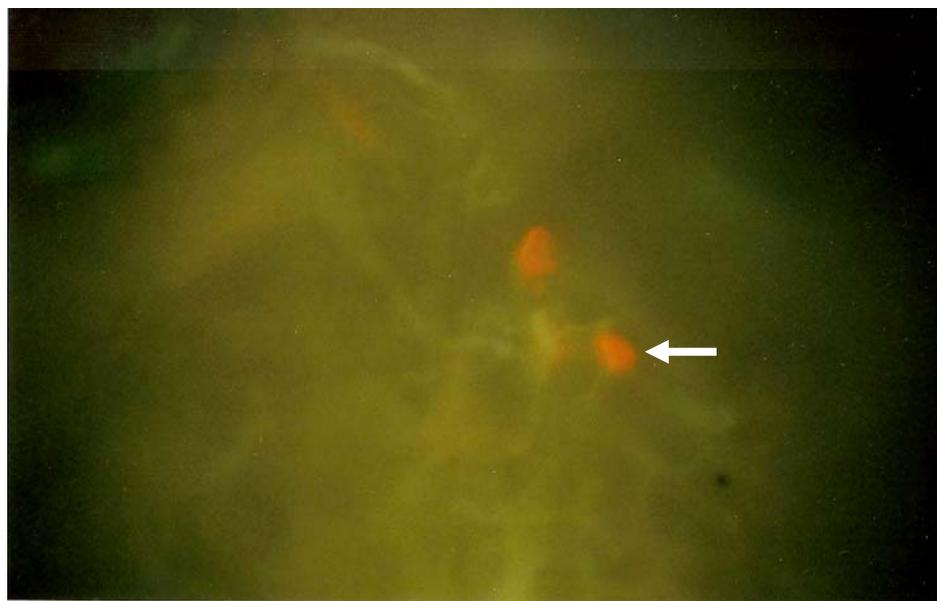


Figura 32. Fotomicrografia do subgrupo B4 (membrana de colágeno em cultura, sem a adição de rhBMP-4 e PRP) com marcador de Iodeto de Propídio. Observa-se a presença de núcleos marcados (seta). Aumento 40x.

5.3 ADESÃO E MORFOLOGIA CELULAR

A morfologia celular foi observada nos diferentes períodos de tempo nos grupos de membrana de colágeno e membrana de PLGA, através de lâminas histológicas com coloração de HE.

No grupo em que se utilizou o arcabouço de PLGA só foi possível confeccionar uma lâmina, mantendo a integridade do arcabouço, provavelmente devido a alta temperatura da parafina que deve ter interferido na estrutura do PLGA.

No grupo da membrana de colágeno, houve subgrupos nos quais não se observaram células aderidas. As presenças ou ausências de células nos cortes histológicos das membranas de colágeno e arcabouços de PLGA estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2- Amostragem da relação dos subgrupos com os dias analisados, quando corados com HE.

Subgrupo	Dias de Cultura			
	6	9	14	21
A1	∅	∅	∅	∅
A2	∅	√	∅	∅
A3	∅	∅	∅	∅
A4	∅	∅	∅	∅
B1	√	√	∅	∅
B2	√	√	∅	√
B3	√	√	∅	√
B4	X	X	∅	X

Legenda: X: subgrupos em que não se visualizaram células aderidas. √: subgrupos com adesão celular. ∅: subgrupos os quais não se obteve a amostra.

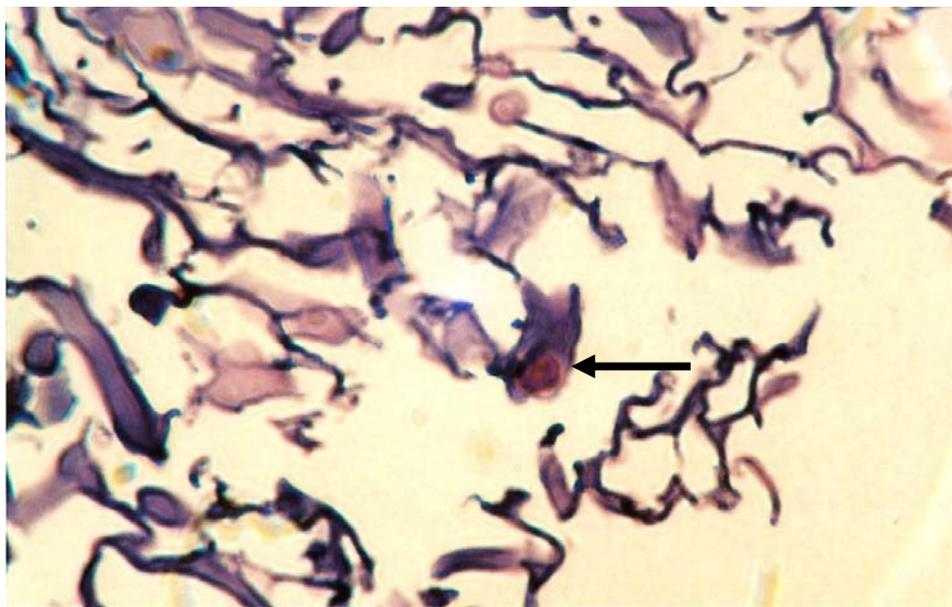


Figura 33. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com BMP, com coloração de HE. Presença de célula aderida ao substrato de colágeno (seta). Aumento 100x.

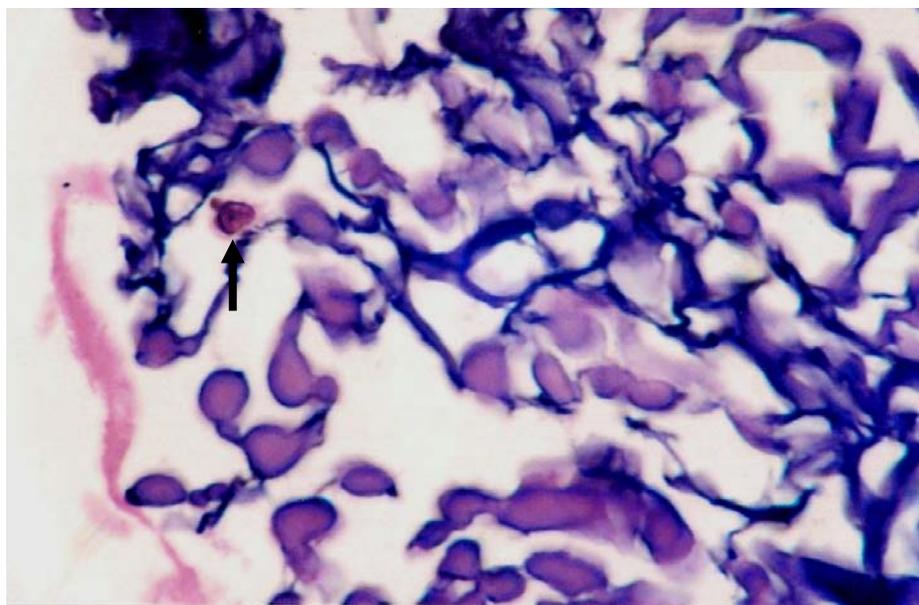


Figura 34. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Presença de célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x.

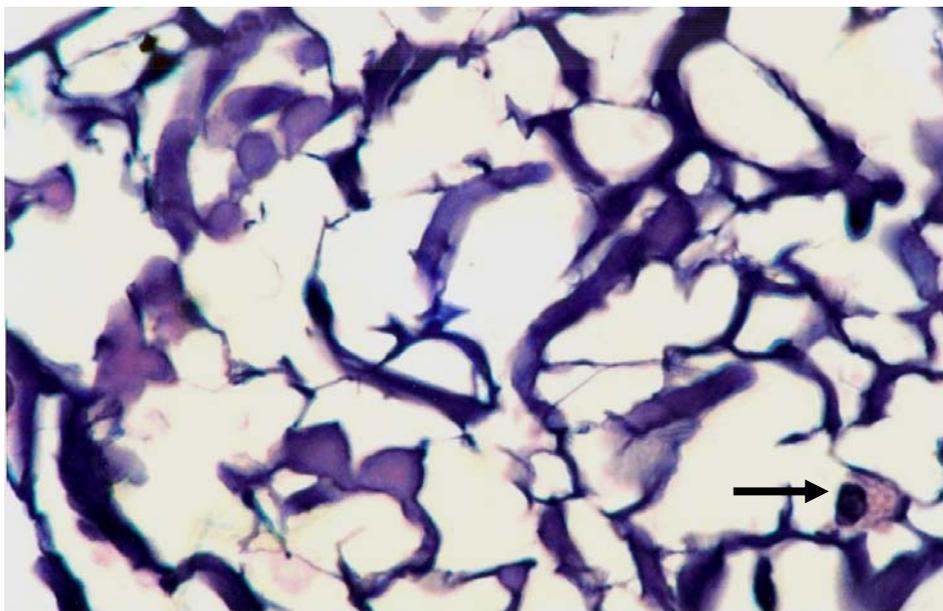


Figura 35. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura com PRP, com coloração de HE. Observa-se célula com núcleo e citoplasma volumoso aderido ao colágeno (seta). Aumento 100x.

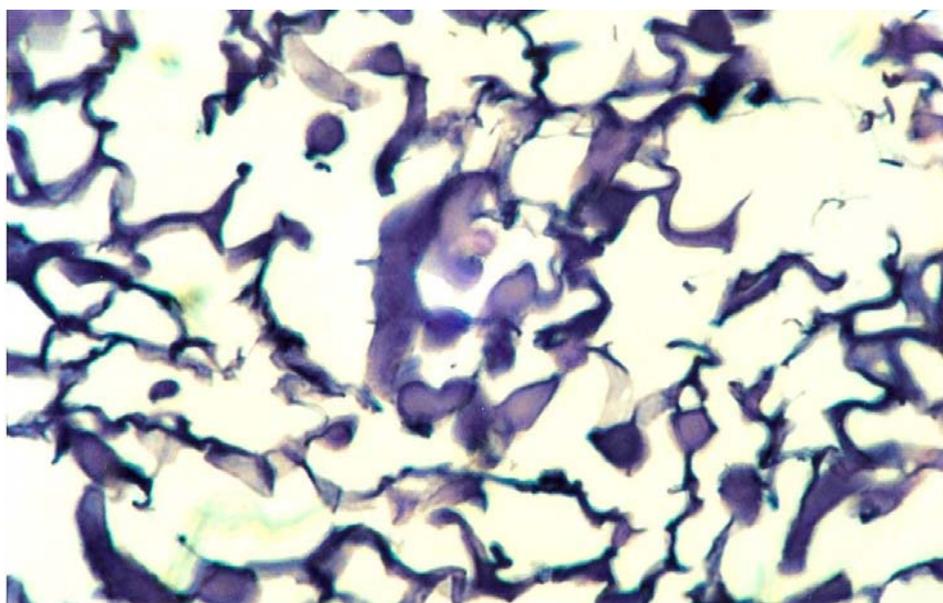


Figura 36. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no sexto dia de cultura sem BMP ou PRP, com coloração de HE, sem células aderidas. Aumento 100x.



Figura 37. Fotomicrografia do arcabouço de PLGA no nono dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Observam-se células aderidas ao substrato (seta). Aumento 100x.

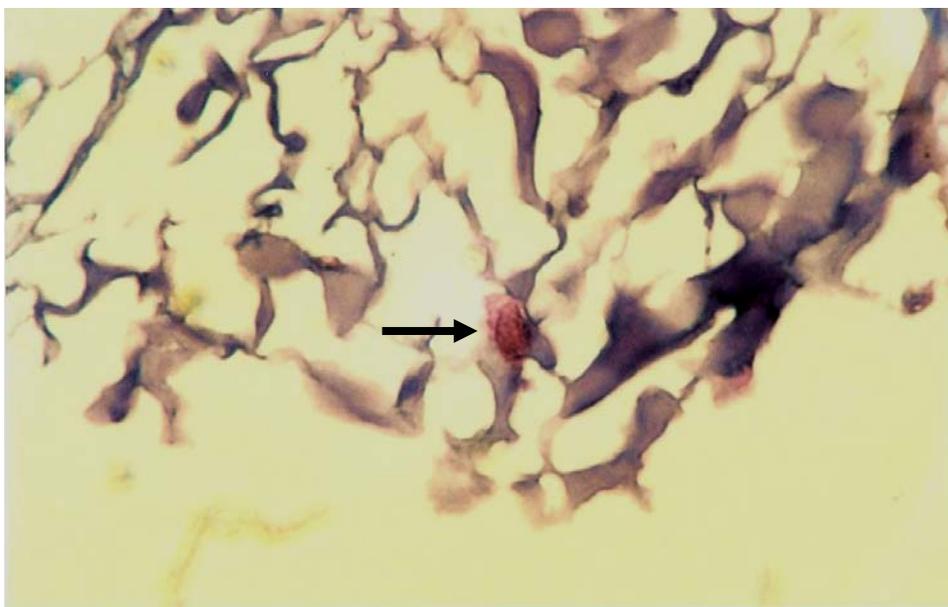


Figura 38. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com BMP, com coloração de HE. Presença de célula aderida (seta). Aumento 100x.

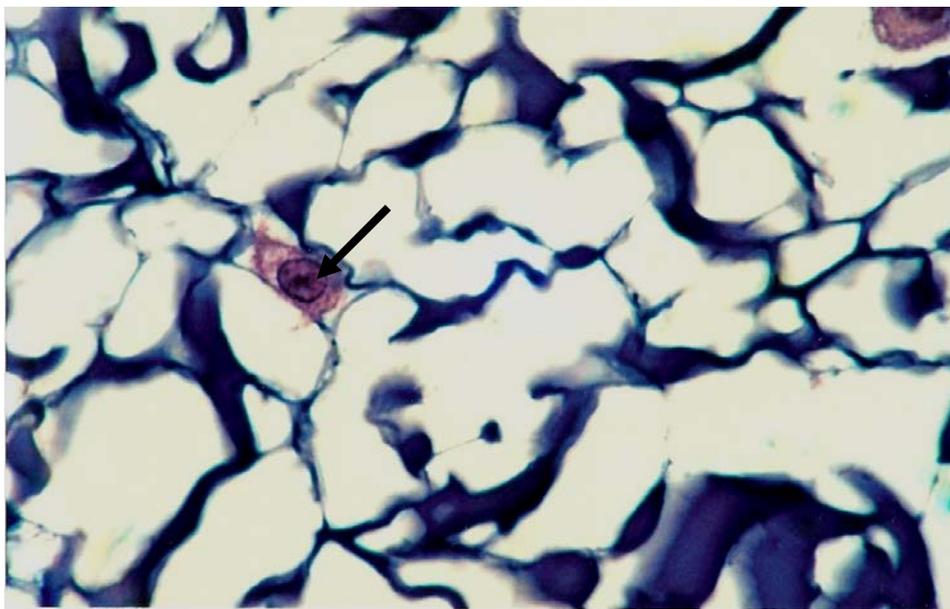


Figura 39. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Presença de célula aderida (seta). Aumento 100x.

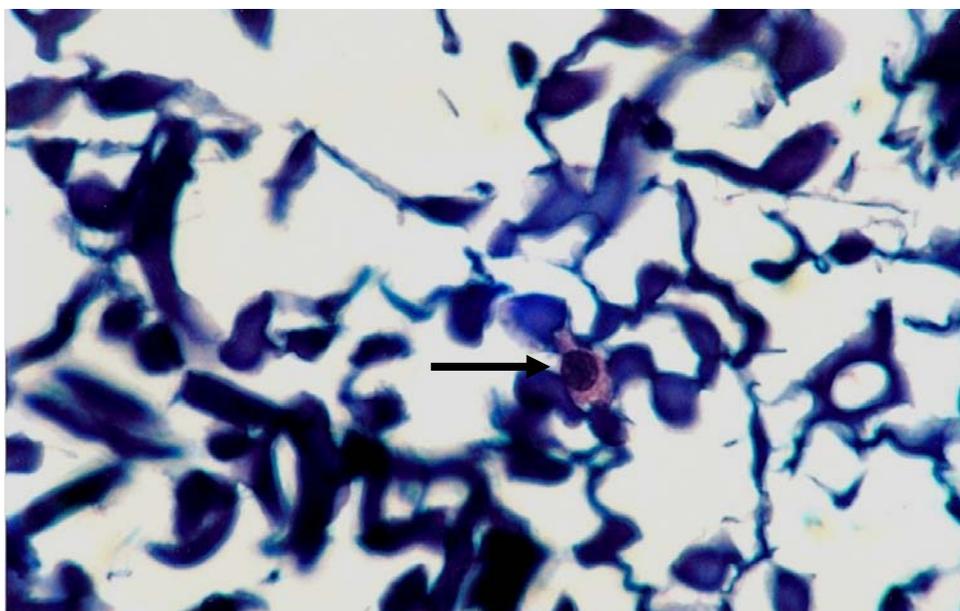


Figura 40. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no nono dia de cultura com PRP, com coloração de HE. Célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x.

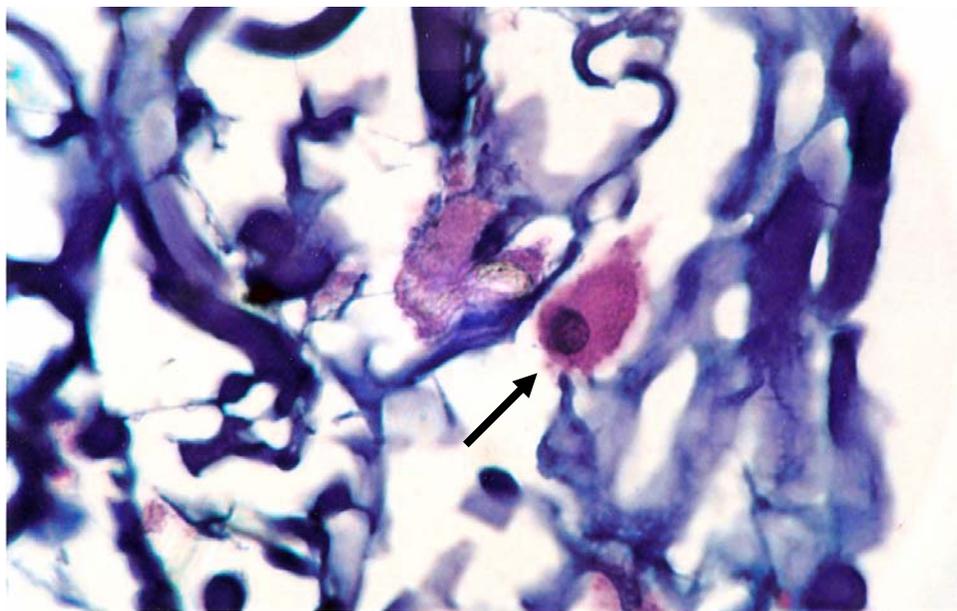


Figura 41. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no vigésimo primeiro dia de cultura com BMP e PRP, com coloração de HE. Célula aderida ao substrato (seta). Aumento 100x.

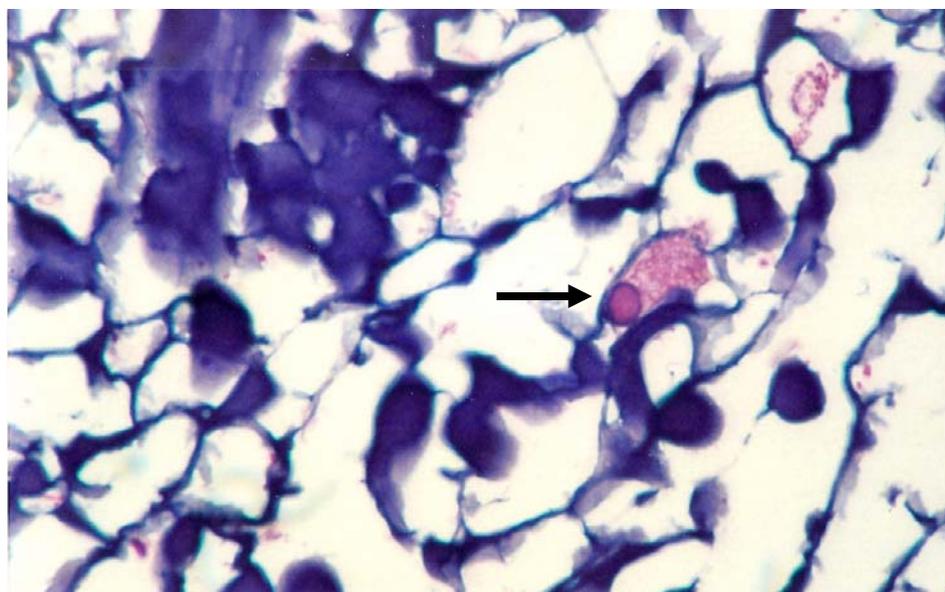


Figura 42. Fotomicrografia da membrana de Colágeno no vigésimo primeiro dia de cultura com PRP, coloração de HE. Célula aderida à membrana (seta). Aumento 100x.

5.4 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ADERIDAS À PLACA DE POLIESTERENO – PERÍODO 21 DIAS

Além da análise da marcação nuclear e da morfologia celular pela coloração com HE, as culturas celulares também foram observadas sem a presença de corantes ao microscópio ótico de luz direta. A seguir nas figuras 43 à 49, estão representadas as fotomicrografias das culturas com seus padrões morfológicos.

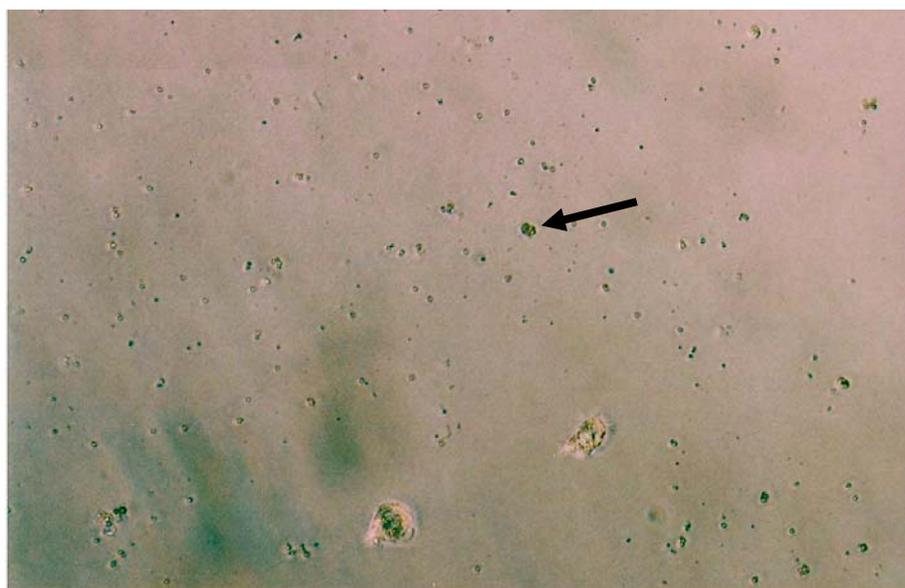


Figura 43. Fotomicrografia da placa de poliestireno usadas neste estudo. Poucas células aderidas (seta). Cultura de CMI com arcabouço de PLGA na presença de rhBMP-4. Aumento 40x.

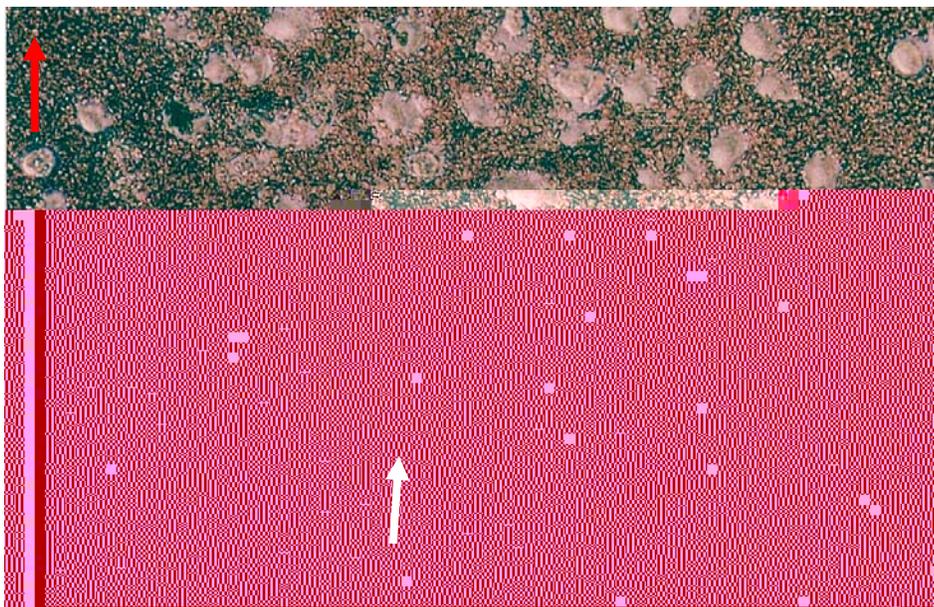


Figura 44. Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA e na presença de rhBMP-4 e do gel de PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblasto (seta branca).

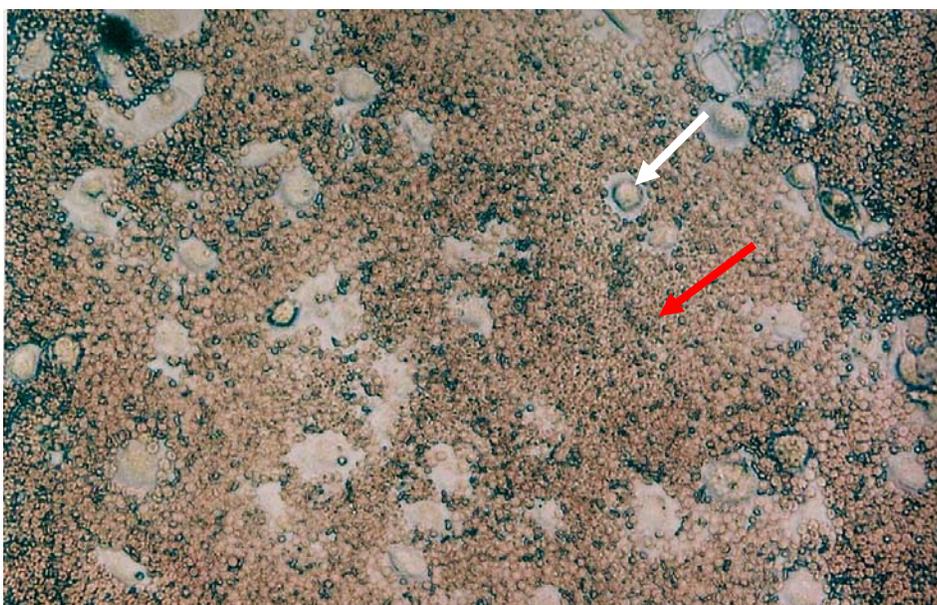


Figura 45. Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA e na presença do gel de PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblastos (seta branca).



Figura 46. Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com arcabouço de PLGA. Poucas células aderidas (seta).

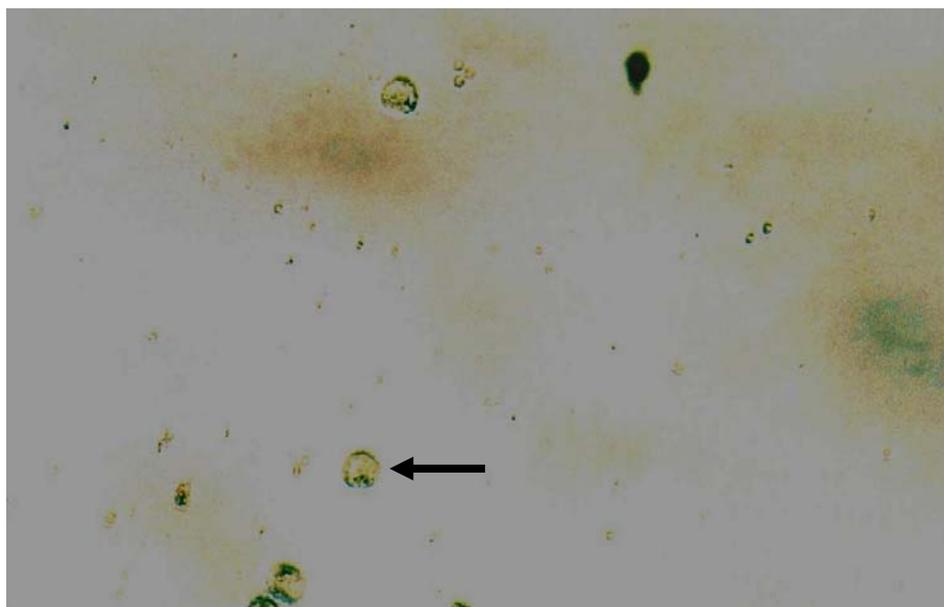


Figura 47. Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença de rhBMP-4. Células aderidas com características de osteoblastos (seta).

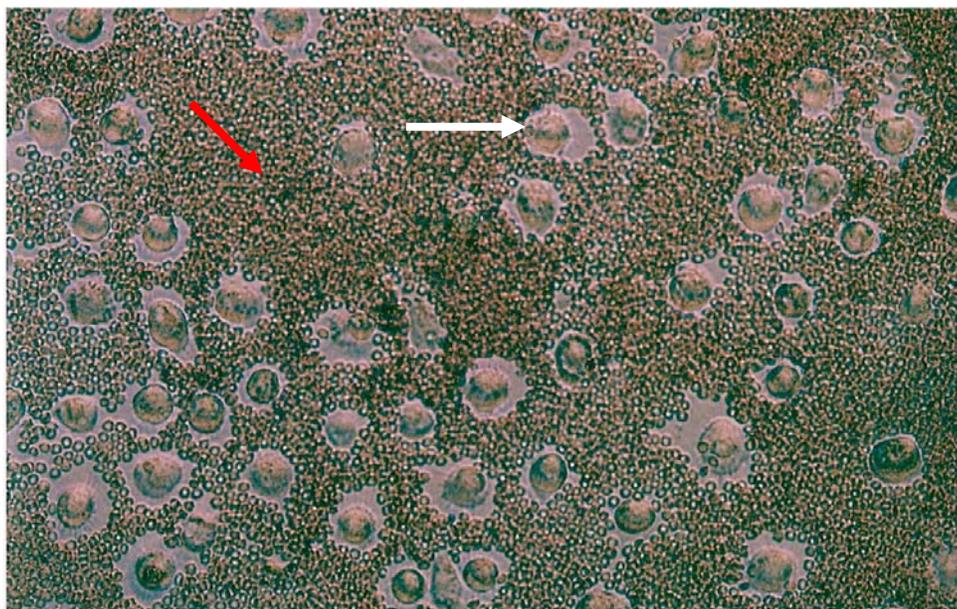


Figura 48. Fotomicrografia da placa de poliestireno. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença de rhBMP-4 e PRP. Presença de hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblasto (seta branca).

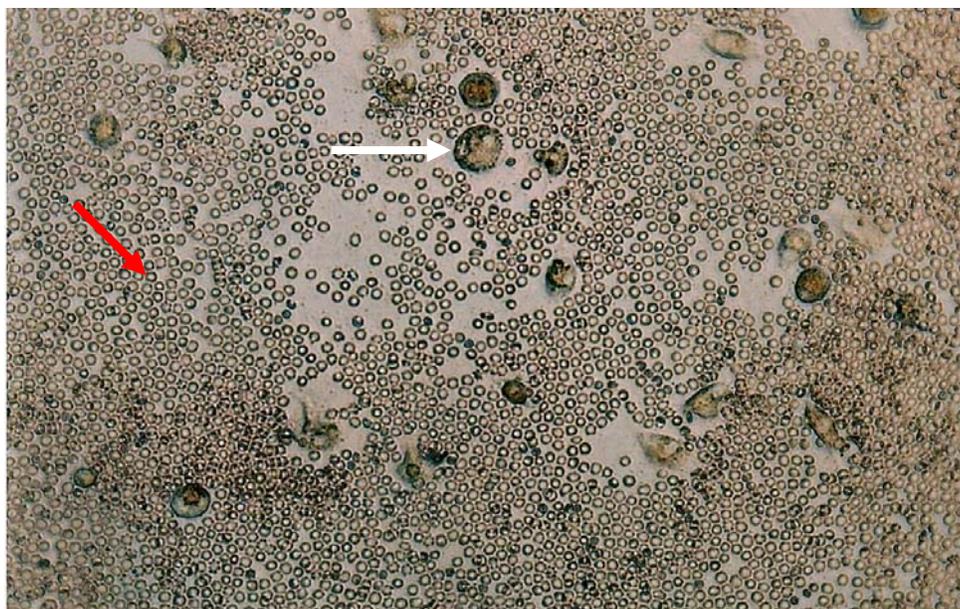


Figura 49. Fotomicrografia da placa de poliestireno usadas nesse estudo. Cultura de CMI com membrana de colágeno e na presença do gel de PRP. Hemácias (seta vermelha) e células com características de osteoblastos (seta branca) presentes.

5.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

5.5.1 PCR em tempo real

A diferenciação celular foi avaliada pela detecção da expressão das proteínas osteopontina e osteocalcina. Essa avaliação foi feita pela detecção indireta dos mRNAs para estas proteínas, seguidas da transcrição reversa e síntese de cDNAs. Foi realizado PCR em tempo real das amostras, incluindo também a detecção da expressão de β -actina.

Foram observados expressão de β -actina, osteopontina e osteocalcina em todas as amostras. Os valores encontrados não permitem distinguir, por esta forma de análise, variações entre os diferentes subgrupos (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados do PCR em tempo real para a expressão de β -actina, Osteopontina e Osteocalcina. Valores em nanogramas.

No.	Teste	β -actina	Oc	Opn
1	PLGA+BMP	0,720	0,318	6,71
2	PLGA+BMP+PRP	133	0,0273	127
3	PLGA+PRP	6,17	1,03	127
4	PLGA-CONTROLE	245	0,0511	127
5	COLAGENO+BMP	0,770	$4,93 \times 10^{-09}$	127
6	COLAGENO+BMP+PRP	0,0123	1,03	127
7	COLAGENO+PRP	6,17	1,03	127
8	COLAGENO-CONTROLE	0,0143	1,03	127
9	PLGA+BMP	0,0108	1,03	127
10	PLGA+BMP+PRP	0,000843	1,03	127
11	PLGA+PRP	0,0178	1,03	127
12	PLGA-CONTROLE	6,17	$1,91 \times 10^{-22}$	127
13	COLAGENO+BMP	50,6	1,03	127
14	COLAGENO+BMP+PRP	1260	1,03	127
15	COLAGENO+PRP	198	0,772	9,09
16	COLAGENO-CONTROLE	$2,53 \times 10^{11}$	756000	127
17	PLGA+BMP	194	1,03	127
18	PLGA+BMP+PRP	201	0,772	127
19	PLGA+PRP	160	1,03	127
20	PLGA-CONTROLE	920	1,03	127
21	COLAGENO+BMP	23,8	$1,46 \times 10^{-08}$	127
22	COLAGENO+BMP+PRP	2480	0,0236	6,97
23	COLAGENO+PRP	11200	0,772	0,772
24	COLAGENO-CONTROLE	109	0,772	11,3
25	PLGA+BMP	244	0,0223E	0,276
26	PLGA+BMP+PRP	204	$2,38E \times 10^8$	1,02
27	PLGA+PRP	186	0,0223	36,0
28	PLGA-CONTROLE	18,4	0,0223	36,0
29	COLAGENO+BMP	20,4	1,13	22,1
30	COLAGENO+BMP+PRP	1180	0,772	0,772
31	COLAGENO+PRP	1,52	0,772	0,772
32	COLAGENO-CONTROLE	175	0,772	37,3
C6	Controle dia 6	3290	0,0223	0,180
C9	Controle dia 9	251	1,62	6,43
C14	Controle dia 14	242	0,772	4,25
C21	Controle dia 21	249	1,73	1,78

Legenda: PLGA: ácido poliglicólico polilático; BMP: proteína morfogenética óssea; PRP: plasma rico em plaquetas; Oc: osteocalcina; Opn: osteopontina

5.5.2 PCR convencional

Esta técnica foi realizada para avaliar a expressão de osteopontina. Foi detectada a presença de transcritos para osteopontina nos grupos: B2 no nono dia de cultura; B2 e B3 no décimo quarto; A2 e A3 no vigésimo primeiro dia, conforme exemplificado na figura 50.

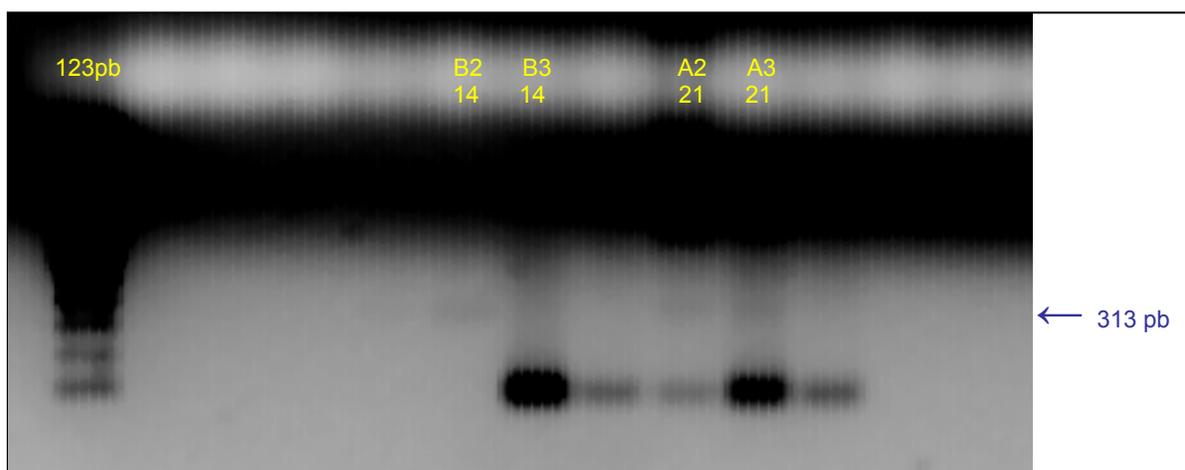


Figura 50- Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos da PCR osteopontina. Marcador de peso molecular de 123pb (M). Grupos B2 e B3 no décimo quarto dia; e A2 e A3 no vigésimo primeiro dia.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A utilização de modelos de culturas celulares *in vitro* tem sido amplamente utilizado para se obter maior domínio a respeito das características dos materiais, e suas indicações e interações com diversos tipos celulares. Assim, os resultados de experimentos *in vitro* incrementam o desenvolvimento de modelos *in vivo* e exploram a relação entre as propriedades dos materiais de implante e suas respostas biológicas (Keller et al. 2003).

Este estudo *in vitro* avaliou a performance das células tronco de medula óssea humana frente o uso de dois tipos de membranas absorvíveis como superfície para a adesão e diferenciação celular. Foram também comparadas as vantagens do uso isolado do PRP e da BMP-4, e na associação desses dois fatores. Esse trabalho segue uma linha de pesquisa de trabalhos de cultura de células da medula óssea *in vitro* realizados por Loro (2002), Silva Junior (2002), Silva (2004) e Paris (2004).

As células coletadas da medula óssea da crista do ílaco foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar o padrão celular. Este teste laboratorial revelou que as populações celulares CD34⁺ e/ ou CD117⁺ corresponderam a aproximadamente 80% das células totais após separação em gradiente de densidade (item 4.3.1). Esse resultado indica que as células utilizadas neste estudo são precursoras de células tronco mesenquimais as quais tem papel fundamental na osteogênese o que corrobora os achados de outros estudos (Loro, 2002; Silva Jr., 2002, Paris, 2004),

principalmente com relação a proteínas indicadoras de osteodiferenciação como a osteopontina e osteocalcina.

As células foram cultivadas em meio de cultura convencional suplementado com 10% de soro fetal bovino. Keller e et al. (2003), constataram, ao examinar a morfologia celular na superfície do material, adesão e rápida proliferação quando as células eram cultivadas na presença de 10% de soro fetal bovino no meio de cultura. O mesmo não é percebido pelos autores em culturas livres de soro, onde não há substancial proliferação celular. A presença de proteínas da matriz extracelular, produzida por osteoblastos ou presentes no meio de cultura, é necessária para o crescimento e a diferenciação celular.

Nessa pesquisa o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Os grupos nos quais foram utilizados a rhBMP-4, o meio de cultura foi trocado após o terceiro dia de experimento e novamente acrescido rhBMP-4, a qual foi, então, removida após o sexto dia, pois estudos mostraram que este fator de crescimento é necessário somente nos primeiros dias de cultura (Nakase et al., 1994). O PRP foi adicionado somente no momento inicial da cultura.

Os períodos de avaliações, 6, 9, 14, 21 dias, seguiram protocolos semelhantes aos anteriormente realizados por Silva Júnior (2002) e Paris (2004). Não houve contaminação fúngica e bacteriana nas culturas, a estabilidade do pH do meio de

cultura e o padrão da morfologia celular permanecem inalterados no decorrer dos períodos.

A avaliação da morfologia das células aderidas à placa de polietileno foi realizada apenas no 21º dia como forma de avaliar se a degradação das membranas de colágeno e PLGA poderiam interferir negativamente na adesão, proliferação e diferenciação celular uma vez que essas são absorvíveis em períodos que variam entre 4 a 6 meses. Este estudo mostrou, após 21 dias de cultura, a presença de adesão celular em todos os poços de cultura. O grupo controle mostrou a presença de células aderidas em baixa quantidade e com volume celular reduzido, sugerindo que não houve diferenciação e proliferação reduzida. Paris (2004) encontrou a presença de células aderidas a placa com aspecto arredondado, com pequenas variações de tamanho, exibindo crescimento em colônias, sendo morfologicamente semelhante ao encontrado por Loro (2002) no primeiro dia e por Silva Júnior (2002) no quarto dia. Paris (2004) também observou no sétimo dia colônias de células em intensa proliferação, o mesmo observado por Loro (2002) no quinto, oitavo e décimo dia experimental. As células apresentavam extensos prolongamentos citoplasmáticos. A partir do sétimo dia também se pode observar células de aspecto circular, compatíveis com células osteogênicas em estágios mais avançados de diferenciação (Loro, 2002; Silva Júnior, 2002; Paris, 2004). Paris (2002) relatou que no período de 14 a 21 dias houve um predomínio de células com morfologia circular compatível com células de linhagem osteogênica. Silva Júnior (2002) encontrou células com morfologia cuboidal com as mesmas características após 15 dias. Neste

estudo, no 21º dia de cultura, as células cultivadas na presença de rhBMP-4 apresentaram-se em número reduzido, mostrando aspecto arredondado, com células de diferentes tamanhos, semelhante ao descrito por Paris (2004). As presenças de hemácias em degradações e de células volumosas e arredondadas, compatíveis com células de linhagem osteogênicas foram detectadas no grupo ao qual foi adicionado o PRP. No grupo onde o PRP e a rhBMP-4 estiveram presentes observou-se hemácias e um grande número de células arredondadas e volumosas, sendo este o grupo onde houve maior proliferação celular.

A adesão celular nas membranas de colágeno e membrana sintética de PLGA foi avaliada nos dias 6, 9, 14 e 21. Para isto realizou-se a análise microscópica das membranas com coloração com iodeto de propídio, que tem por finalidade a marcação do núcleo celular e HE para visualização da morfologia celular. A análise das amostras do sexto dia de cultura mostrou a adesividade das células da medula óssea tanto na membrana de colágeno como na membrana sintética de PLGA. Nesse momento da cultura, haviam poucos núcleos corados, sugerindo a presença de um reduzido número de células aderidas, isto é, as células ainda não se encontravam em proliferação intensa.

Analisando as culturas dos dias 9, 14 e 21 notou-se uma maior marcação de núcleos celulares, com aderência em todas as membranas, sendo que nos grupos tratados com PRP houve maior número de células presentes quando comparados aos outros tratamentos. Nesses dias também foi possível observar a aderência das

células da medula óssea na membrana de PLGA em diferentes profundidades. Isso sugere que ocorre uma adesão não somente de superfície, mas também nas lacunas e nas laterais da membrana e em seus três planos. Os grupos que não receberam PRP e rhBMP-4 apresentaram menor número de núcleos corados. Devido à característica tridimensional da membrana de PLGA não foi possível realizar uma contagem precisa do número de células aderidas.

Este estudo mostrou haver uma relação positiva entre a proliferação e a adesão celular com o uso do PRP. Todos os grupos nos quais foram utilizados PRP houve um maior número de células aderidas tanto na membrana de colágeno como na membrana de PLGA, quando comparados com os demais grupos.

Recentemente a engenharia de tecido tem recebido grande atenção dos pesquisadores e diversos artigos têm sido publicados, sendo sua grande maioria em modelos animais. A regeneração óssea através da engenharia de tecidos com transplante autógeno de células é um dos mais promissores conceitos sendo desenvolvido, já que poderão eliminar uma área de morbidade devido a retirada de enxerto autógeno, bem como reduzir o risco de rejeição do organismo inerentes aos enxertos alógenos, alográficos e xenográficos (Caplan, 1991).

As células mesenquimais têm sido descritas como células multipotentes que podem se replicar como células indiferenciadas e tem ainda a capacidade de se

diferenciar em células da linhagem mesenquimal, como osso, cartilagem, gordura e músculo (Caplan 1991; Pittenger 1999).

Chou et al. (2005) induziram diferenciação de células tronco da medula óssea humana cultivadas sobre uma membrana não-absorvível (poliestireno), evidenciando a regulação de osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea. Relataram que o fato de utilizar uma membrana não absorvível teria como desvantagem a necessidade de sua remoção posterior. Entretanto, o uso de membrana absorvível pode liberar subprodutos de sua decomposição que seria problemático porque a diferenciação celular pode necessitar de vários dias de ausência de fatores externos. Portanto, esses fatores poderiam alterar o pH local ou mesmo o metabolismo e comportamento celular. Para Sung (2004), a degradação do suporte de PLGA alterou o pH normal e acabou afetando também a viabilidade celular após 28 dias em cultura. Porém, não foi possível afirmar que modelos bi-dimensionais teriam o mesmo comportamento que os modelos tri-dimensionais.

Neste estudo não foram encontradas diferenças com relação ao aspecto das células aderidas a placa de poliestireno, sugerindo que não parece haver prejuízo pela decomposição ou degradação do arcabouço de PLGA ou da membrana de colágeno, embora estas culturas tenham sido avaliadas somente até o 21º dia.

Diversos estudos *in vivo* têm sido relatados mostrando a influência do PRP nos processos de reparo ósseo, principalmente nos casos de enxerto autógenos.

Ohya et al. (2005) compararam duas técnicas de elevação do seio maxilar em coelhos. O grupo controle recebeu enxerto medular da crista do íliaco adicionado ao PRP, enquanto o grupo teste recebeu o PRP com células mesenquimais indiferenciadas. Ambos os grupos apresentaram regeneração óssea, mesmo em duas semanas, com um grau elevado de atividade osteoblástica e neoformação vascular. Os autores não observaram diferença histológica significativa entre os grupos em relação ao volume e altura óssea durante o período observado 2, 4 e 8 semanas. Entretanto, apresentou ganho ósseo quando compararam as semanas 2 e 8 em ambos os grupos.

Marx et al. (2004) descreveram a atividade óssea em pacientes com defeitos mandibulares de 5 cm ou mais que receberam enxerto ósseo autógeno com e sem o uso concomitante de PRP. Encontraram que, em 2, 4 e 6 meses pós-enxerto, as áreas que haviam recebido PRP apresentavam osso mais maduro que a região sem PRP. Em 6 meses, a histologia mostrou um melhor trabeculado ósseo onde foi adicionado o PRP. Com isso, os autores sugerem que a razão para essa diferença está na liberação de fator de crescimento e transformação- β e fator de crescimento derivado das plaquetas, que seria um estímulo para células tronco e células progenitoras de osteoblasto se dividirem, diferenciarem e iniciar a formação óssea enquanto induziria a mitose de células endoteliais e subsequente angiogênese. Descrevem também que esse aspecto pode ser encontrado mesmo antes de 6 meses.

Nesses últimos anos os estudos sobre o PRP associado ao uso de BMP revelaram resultados bastante contraditórios. Roldan et al. (2004) avaliaram o efeito de PRP e BMP em material autógeno e alógeno usado em áreas de defeitos crítico mandibulares de ratos e não encontram benefício no uso de PRP. Choi et al. (2004) avaliaram o uso de PRP em enxerto ósseo autógeno em mandíbula de cães e não acharam diferença significativa em 6 semanas. Sugeriram apenas que possa haver um efeito na remodelação óssea. Robiony et al. (2002) usaram PRP em conjunto com enxerto ósseo autógeno e distração óssea em severas atrofas mandibulares em 5 pacientes e sugeriram que o PRP favorece a cicatrização, entretanto não possuíam grupo controle no experimento.

Philippart et al. (2003) descreveram o uso de PRP em conjunto com enxerto autógeno para levantamento de seio maxilar de 18 pacientes. Observaram que essa associação aumenta a vascularização e o número de osteoblastos, porém não possuía grupo controle. Oyama et al. (2004) avaliaram, por tomografia computadorizada, 7 pacientes com fissura lábio-palatina que receberam enxerto ósseo autógeno juntamente com PRP. Comparando com o grupo controle, os autores afirmaram que o grupo teste apresentou um maior volume ósseo. Jakse et al. (2003) relataram o uso de PRP em levantamento de seio maxilar de ovelhas usando enxerto autógeno. O exame histomorfométrico em 4 e 12 semanas mostrou que o PRP produziu um efeito positivo, mas sem diferenças estatisticamente significativas, na neoformação óssea e no contato entre leito receptor e enxerto.

Segundo Gerard et al. (2006), a hipótese de que o PRP poderia melhorar o processo de cicatrização em enxertos ósseos autógenos na mandíbula de cães parece ser verdade apenas nos meses iniciais (1 e 2 meses), como se percebe em relação à formação óssea adjacente ao enxerto. Em 3 e 6 meses o PRP não levou a nenhum benefício extra em relação à cicatrização óssea, volume ósseo ou mesmo densidade radiográfica.

Esses relatos levam a supor que o maior número de células observadas no presente estudo, quando utilizado o PRP, também possa ocorrer *in vivo*, levando a um aumento do número de células e, possivelmente, viabilizando um reparo mais rápido, mantendo a qualidade da cicatrização.

Wu et al. (2006) mostraram que o tamanho dos poros do arcabouço de PLGA não interferiram no comportamento do osteoblasto em cultura *in vitro*. Entretanto, o tratamento da superfície do PLGA com colágeno aumentou a adesão e a proliferação, enquanto o tratamento com quitosan afetou positivamente a diferenciação celular. A cultura foi realizada até o 14º dia, e a proliferação osteoblástica continuava até esse momento.

Os arcabouços de PLGA utilizados no presente estudo tinham origem comercial, ou seja, já são utilizados em terapia humana, não possuem tratamento na sua superfície e, no entanto, observou-se adesão, proliferação e diferenciação celular que variaram conforme o tempo e o substrato da cultura.

Foi possível observar, nas células aderidas na placa de poliestireno, que nos grupos onde foram utilizadas rhBMP-4 e PRP, isoladas ou associadas, houve alteração da morfologia celular, com citoplasma mais abundante e núcleos aumentados, sugerindo que tenha ocorrido diferenciação celular a partir das CMI.

A análise pela técnica de PCR em tempo real mostrou que havia expressão das três proteínas estudadas, β -actina, osteopontina, e osteocalcina. No entanto, não foi possível detectar diferenças nos padrões de expressão dessas proteínas entre diferentes subgrupos ou entre os diferentes tempos de cultura.

Chou (2005) cultivou células pré-osteoblásticas sobre diferentes membranas de PLGA, verificando adesão celular em todos os tipos, e realizou PCR em tempo real para verificar o grau de diferenciação dessas células. Encontrou expressão de osteopontina e osteocalcina em todas as amostras, porém esta variou em quantidade com o tempo, relatando um aumento dessa expressão com períodos de cultura mais longos.

Assim, embora não tenha sido possível obter dados precisos com relação aos níveis de expressão das proteínas osteopontina e osteocalcina, foi possível determinar que estas proteínas estavam presentes nas culturas submetidas aos quatro diferentes tratamentos proposto neste estudo, indicando diferenciação em células da linhagem osteogênica. Futuramente, a presença de outras proteínas expressa por osteoblastos também serão investigadas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) As células mesenquimais da medula óssea humana aderem e se proliferam sobre a membrana de colágeno bovino e sobre arcabouço de ácido poliglicólico polilático (PLGA).

- b) As células mesenquimais da medula óssea humana proliferam na presença de PRP e/ ou rhBMP-4. O uso do PRP acelera a proliferação celular *in vitro* mais intensamente do que a rhBMP-4 isolada.

- c) O uso da rhBMP-4 e/ ou PRP induz a diferenciação das células de medula óssea humana em células da linhagem osteogênica *in vitro*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Investigation of Platelet-Rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J Oral Maxillofac Surg**, Chicago, v.60, n.10, p.1176-81, Oct. 2002.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of the use in the preparation of future sites for implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 14, n. 4, p. 529-35, Jul-Aug 1999.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Oxford, v.21, n. 7, p. 667-681, Apr. 2000.

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

AUBIN, J. E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, N.Y., v. 72, n. 3, p. 396-410, Mar. 1999.

BARBOZA, E.; CAÚLA, A.; MACHADO, F. Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. **Implant Dentistry**, Baltimore, MA., v. 8, n. 4, p. 360-367, 1999.

BELTRÃO, G.C.; ANDRADE, M.G.S. Aspectos biológicos da utilização do gel de plasma rico em plaquetas nas reconstruções maxilares com enxertos. **BCI**, v. 8, n. 32, p. 324-328, 2001.

CAIAZZA, S. et al. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. **Implant Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 219-25, 2000.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, N.Y., v. 9, n. 5, p. 641-650, Sep. 1991.

CARLSON, N.E.; ROACH, R.B. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 133, n. 10, p. 1383-6, Oct 2002.

CHAVES JR., A.C. Estudo comparativo entre protocolos simplificados para a obtenção de plasma rico em plaquetas. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 86p, Porto Alegre, 2003.

CHAMPAGNE, C. M. et al. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. **Bone**, New York, N.Y., v. 30, n. 1, p. 26-31, Jan. 2002.

CHEN, D. et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. **Calcified Tissue International**, New York, N.Y., v. 60, n. 3, p. 283-290, Mar. 1997.

CHOI, B.H.; IM, C.J.; HUH, J.Y.; et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, p. 56, 2004.

CHOU et al. In vitro response of MC3T3-E1 preosteoblasts within three-dimensional apatite-coated PLGA scaffolds. **J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater**, v. 75B, p. 81-90, 2005.

DINATO, J.C.; POLIDO, W.D. **Implantes Osseointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 398 p.

EINHORN, T. A. Enhancement of fracture-healing. **The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume**, Boston, v. 77, n. 6, p. 940-956, June 1995.

EPPLEY B.L., WOODSELL J.E., HIGGINS J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 6, p. 1502-8, Nov 2004.

FANBURG, J. C.; BRATTHAUER, G. L.; MIETTINEN, M. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskeletal osteosarcoma; a study of 28 cases. **Human Pathology**, Philadelphia, PA., v. 30, n. 1, p. 32-38, Jan. 1999.

GARG, A.K. Grafting material in repair and restoration. **Tissue Engineering**, 1^a ed, Illinois, Quintessense Books, p.83-101, 1999.

GANDHI, A. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. **Bone** V. 17 Dec 2005.

GERARD, D.; CARLSON, E.R.; GOTCHER, J.E. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **J Oral Maxillofac. Surg.**, v. 64, p. 443-51, 2006.

GIANNOBILE, W.V. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. **Tissue Engineering**, 1^a ed. Illinois, Quintessense Books, p.231-43, 1999.

GRAY, C.; BOYDE, A.; JONES, S. The isolation, culture, and function assay of osteoclasts and osteoblasts. In: CELIS, Julio E. (Org.). **Cell biology: a laboratory handbook**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 142-148.

GUO, W. et al. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 365, p. 175-183, Aug. 1999.

HONDA, Y. et al. Osteogenic protein-1 stimulates mRNA levels of BMP-6 and decreases mRNA levels of BMP-2 and -4 in human osteosarcoma cells. **Calcified Tissue International**, New York, N.Y., v. 60, n. 3, p. 297-301, Mar. 1997.

JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin. Oral Implants Res.*, v. 14, p. 578, 2003.

KATAGIRI, T. et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, N.Y., v. 172, n. 1, p. 295-299, Oct. 1990.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, Copenhagen, v. 8, n. 3, p. 147-159, May 2002.

KELLER, J. C. et al. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. **Implant Dentistry**, Baltimore, v.12, n. 2, Feb. 2003

KIM, K. J.; ITOH, T.; KOTAKE, S. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, N.Y., v. 35, n. 3, p.279-285, June 1997.

KREBSBACH, P. H., et al. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Boca Raton, FL., v. 10, n. 2, p. 165-181, 1999.

KÜBLER, N. R., et al. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. **International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 305-309, Aug. 1998.

LEE, S.J. et al. Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric acid-treated biodegradable polymer surfaces. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 13, p. 197-212, 2002.

LEE, S.J. et al. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 27, p. 3466-3472, 2006.

LENHARO, A. Plasma rico em plaquetas. *Revista Catarinense de Implantodontia*, v. 1, n. 3, p. 6-8, Dez 2001.

LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, La Jolla, CA., v. 27, n. 3, p. 677-690, May-June 2001.

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

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, p.638-64, 1998.

MARX, R.E. **Tissue Engennering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. São Paulo: Quintessence books, 1999, p.71-82.

MARX, R.E. Platelet rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, p. 489, 2004.

MARX, K; GARG, A.K. **Dental and craniofacial applications of platelets rich plasma**. Illinois, Quintessence Books, 1ed., 154p., 2005.

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 263, p. 30-48, Feb. 1991.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 113, Pt. 7, p. 1161-1166, Apr. 2000.

MURATA, M., et al. Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 27, n. 5, p. 391-396, Oct. 1998.

MURATA, M., et al. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 28, n. 3, p. 232-237, June 1999.

MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 395, p. 66-80, Feb. 2002.

MUTHUKUMARAN, N.; REDDI, A. H. Bone matrix-induced local bone induction. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 200, p. 159-164, Nov. 1985.

NAGAI, N., et al. Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 28, n. 2, p. 143-150, Apr. 1999.

NAKASE, T.; et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 9, n. 5, p. 651-659, May 1994.

NISHIMURA, R., et al. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, MD., v. 273, n. 4, p. 1872-1879, Jan. 1998.

OHYA, M. et al. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 16, p. 622-629, 2005.

OKUBO, Y., et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p.62-66, Feb. 2000.

OYAMA, T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 555, 2004.

OZMERIÇ, N. et al. The effect of a collagen membrane in regenerative therapy of a two-wall intrabony defects in dogs. **Periodontal Clinical Investigation**. v. 22, n. 1, p. 22-30, 2000.

PARIS, M.F. Avaliação da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de hidróxiapatita e titânio. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 142 p., Porto Alegre, 2004.

PARTRIDGE, K., et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. **Biochemical**

and **Biophysical Research Communications**, New York, N.Y., v. 292, n. 1, p. 144-152, Mar. 2002.

PETITE, H., et al. Tissue-engineered bone regeneration. **Nature Biotechnology**, New York, N.Y., v. 18, n. 9, p. 959-963, Sep. 2000.

PHILIPPART, P. et al. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma and tetracycline induce a high-quality human bone graft : a 5-year study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.18, p. 411, 2003.

PITTENGER, M. F., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Washington, D.C., v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

RAMOSHEBI, L. N., et al. Tissue engineering: TGF-b superfamily members and delivery systems in bone regeneration. **Experimental Reviews in Molecular Medicine**, Oxford, Sep. 2002. Disponível em : <<http://www.expertreviews.org/02004969h.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2005.

RAVAL, P., et al. Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 75, n. 7, p. 1518-1523, July 1996a.

RAVAL, P., et al. Osteoinductive ability of confluent Saos-2 cell correlates with enhanced expression of bone morphogenetic proteins. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, N.Y., v. 14, n. 4, p. 605-610, July 1996b.

REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 8, n. 1, p.11-20, Mar. 1997.

ROBIONY, M.; POLINI, F.; COSTA, F.; et al. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, p. 630, 2002.

ROLDAN, J.C.; JEPSEN, S.; MILLER, J.; et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. **Bone**, v. 34, p. 80, 2004.

SCULEAN A. et al. Healing of intra-bony defects following treatment with a composite bovine-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). **Journal of Clinical Periodontology**. v. 32, n. 7, p. 720-4, Jul 2005.

SILVA, T. Efeito da rugosidade de superfície de discos de titânio sobre a proliferação e diferenciação de células de medula óssea humana. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 112p, Porto Alegre, 2004.

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.

SOLHEIM, E. Growth factors in bone. **International Orthopaedics**, Berlin, v. 22, n. 6, p. 410-416, Feb. 1998.

SOTTILE, V. et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. **Bone**, New York, N.Y., v. 30, n. 5, p. 699-704, May 2002.

SUNG, H.J. et al. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials**. v. 25, pag. 5735-42, 2004.

TAL, H., et al. Guided periodontal regeneration using bilayered collagen membranes and bovine bone mineral in fenestration defects in the canine. **International Journal of Periodontics Restorative Dentistry**. v, 25, n. 5, p. 509-18, Oct 2005.

THALMEIER, K., et al. Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice. **Acta Haematologica**, Basel, v. 105, n. 3, p. 159-165, 2001.

TURGEMAN, G., et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. **The Journal of Gene Medicine**, Chantilly, v.3, n.3, p.240-251, May-June 2001.

URIST, M. R. Bone: Formation by Autoinduction.1965. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 395, p. 4-10, Feb. 2002.

URIST, M. R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. M. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, Washington, D.C., v. 220, n. 4598, p. 680-686, May 1983.

WOZNEY, J. M., et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, Washington, D.C., v. 242, n. 4885, p. 1528-1534, Dec. 1988.

WOZNEY, J. M., et al. Growth factors influencing bone development. **Journal of Cell Science. Supplement**, Cambridge, v. 13, p. 149-156, 1990.

WU, Y.C.; et al. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, p. 896-904, 2006.

YAMAGUSHI, A. Recent advances in research on bone formation -role of BMP in bone formation. **Nippon Rinsho**, Osaka, v. 56, n. 6, p. 1406-1411, June 1998.

YAMAMOTO, N.; FURUYA, K.; HANADA, K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, n. 4, p. 509-515, Apr. 2002.

YOON, S. T.; BODEN, S. D. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, PA., n. 395, p. 33-43, Feb. 2002.

ZHOU, H., et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. **Journal of Cellular Physiology**, New York, N.Y., v. 155, n. 1, p. 112-119, Apr. 1993.

ANEXO A – MODELO DO TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Resolução 196/96 do CNS/MS)

“Análise *in vitro* da proliferação e diferenciação de células tronco de medula óssea humana cultivadas sobre membranas de colágeno bovino com o uso do gel de plasma rico em plaquetas”

Ressalto que a sua concordância em participar desse estudo não implica em qualquer modificação no tratamento indicado. Da mesma forma a sua discordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento a ser estabelecido.

Eu, _____,

RG _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito do tratamento que será efetuado. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Guilherme Genehr Fritscher explicou-me que os dados desta pesquisa a mim referentes serão documentados fotograficamente, e poderão ser utilizadas em pesquisas, em eventos e publicações científicas, bem como meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, ou na publicação das imagens face a estas informações. Foi me garantido também o sigilo quanto a minha exposição, e que meu nome só aparecerá no prontuário de controle dos pacientes e, se por necessidade meu caso for usado para apresentação em revistas da área de CTBMF ou em eventos de caráter científico meu nome será apresentado somente pelas iniciais e minhas imagens de face conterão tarjas para não permitir a exposição de minha imagem em público.

Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com o Dr Guilherme Fritscher pelo telefone: 9916-6945 / 3343-0475

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do paciente

RG do Paciente

Guilherme Genehr Fritscher RG do Pesquisador 2066355245

Este formulário foi lido para _____ em
_____/_____/_____ por Guilherme Genehr Fritscher enquanto eu estava
presente.

Testemunha: _____

RG:

ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão Científica e de Ética da FO-
PUCRS



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

Porto Alegre 12 de maio de 2006

O Projeto de: Dissertação

Protocolado sob nº: 0029/06
Intitulado: Análise in vitro da proliferação e diferenciação de células tronco de medula óssea humana cultivadas sobre membranas de colágeno bovino com o uso do gel de plasma rico em plaquetas
Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Denise Cantarelli Machado
Pesquisadores Associados: Guilherme Genehr Fritscher
Nível: Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 28 de abril de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS.

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

ANEXO C – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 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 1019/06-CEP

Porto Alegre, 28 de agosto de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEP 06/03347, intitulado: **“Análise in vitro da proliferação e diferenciação de células tronco de medula óssea humana cultivadas sobre membranas de colágeno bovino com o uso do gel de plasma rico em plaquetas”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser apresentados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Góldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Dra Dense Cantarelli Machado
N/Universidade

5514-6417 - 5514-6418 - 5514-6419

www.pucrs.br