UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA GONÇALVES SICCHIERI

ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BIOMATERIAL HÍBRIDO ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO/FOSFATO DE CÁLCIO E CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO.

Ribeirão Preto

2010

LUCIANA GONÇALVES SICCHIERI

ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BIOMATERIAL HÍBRIDO ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO/FOSFATO DE CÁLCIO E CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial
Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Sicchieri, Luciana Gonçalves

Engenharia de tecido ósseo: avaliações *in vitro* e *in vivo* do biomaterial híbrido ácido poli-láctico-co-glicólico/fosfato de cálcio e células osteoblásticas derivadas de células-tronco. Ribeirão Preto, 2010.

118 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. PLGA/CaP. 2. Células osteoprogenitoras. 3. Osteogênese.
4. Engenharia óssea.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Gonçalves Sicchieri

Engenharia de tecido ósseo: avaliações *in vitro* e *in vivo* do biomaterial híbrido ácido poli-láctico-co-glicólico/fosfato de cálcio e células osteoblásticas derivadas de células-tronco.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de
Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão
Preto – USP, com auxílio financeiro da Fundação
de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)**

Dedicatória

À Deus, pela vida, pela inteligência, pelas oportunidades, pelas dificuldades, pela família, pelas experiências vividas, enfim, por tornar este momento possível.

À minha mãe, Lélia Faria Gonçalves, pelo apoio, compreensão e amor. Por me dar forças, nos momentos de fraqueza, o que me fez alcançar mais uma etapa em minha vida. Pelo exemplo de vontade, garra e perseverança, o que fez com que eu alcance meus objetivos, tendo sempre em você a fonte de inspiração. A você meu eterno amor e gratidão.

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos, Fernando Antonio Sicchieri e Matheus Gonçalves Sicchieri, pelo amor e amizade durante toda minha vida, às respectivas cunhadas Eliane Sicchieri e Aline Rodrigues pela amizade sincera, aos sobrinhos Nicolas e Guilherme e ao afilhadinho César Augusto.

Ao Arlindo Florian pelo amor, apoio e encorajamento.

Ao meu noivo, Lucas Teixeira de Ponton por estar presente neste momento importante da minha vida, pelo apoio, pela paciência com os meus “pitis” nos momentos de estresse, por ser essa pessoa tão especial que Deus me presenteou.

Aos meus sogros Cândido José Telles Ponton e Meiry Teixeira de Lima Ponton, pelo apoio e amor que vocês têm por mim. Vocês são meus segundos pais, e sou muito feliz por vocês fazerem parte da minha vida

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, pela tranquilidade e paciência em ensinar, por todo aprendizado que obtive nestes anos de Pós-Graduação, por ter acreditado em mim para execução deste trabalho, e pelo grande exemplo como pesquisador e docente.

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela acolhida durante os cursos de Especialização e Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Aos Professores Paulo Tambasco de Oliveira e Marcio Mateus Beloti pelas ajudas na execução e finalização deste trabalho, por tudo que vocês me ensinaram.

Ao Professor John E. Davies do *Institute for Biomaterials and Biomedical Engineering (University of Toronto, Canadá)* por gentilmente fornecer os arcabouços de PLGA/CaP para que este trabalho pudesse ser executado.

À professora Maria Luiza Nunes Mamede Rosa, pela amizade, pelas oportunidades, pelas novas experiências aprendidas, por ampliar meus horizontes.

Ao Professor Valdemar Mallet da Rocha Barros, pelas orientações em aulas e seminários, por ser um professor dedicado em ensinar, e por contribuir na minha formação como mestre em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Aos Professores Samuel Porfirio Xavier e Francisco Veríssimo de Mello Filho pela amizade e carinho, por estarem presentes em alguns momentos difíceis da minha vida pessoal, por todo ensinamento durante o período da especialização, e por ajudar-me a crescer profissionalmente.

Aos demais Professores do departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Luiz Antonio Salata, Cássio Edvard Sverzut, Alexandre Elias Trivellato, Arthur Belém Novaes Júnior, Sérgio Luís Scombatti de Souza, Daniela Bazan Palioto, Márcio Fernando de Moraes Grisi, Mário Taba Júnior.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia. Em especial ao Gledson Antunes da Silva, muito obrigada pela amizade e ajuda em alguns momentos. À Rosangela Aparecida Ferezim pelas ajudas na clínica. À Aparecida Dulce de Oliveira Negreti e à Tatiana Angeli Passos Fernandes.

À Junia Ramos, que acompanhou cada passo meu neste trabalho, muito obrigada, pelas ajudas nos experimentos, pelos horários de almoço e jantar perdidos, pela paciência para ensinar os protocolos e principalmente pela admiração e amizade que ficou.

À Grasielle Edilaine Crippa, pela amizade, pelos conselhos, pela ajuda com o PCR, e por todo aprendizado que você me proporcionou.

Ao Técnico do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto Antonio Sérgio Ap. Mesca, por toda paciência em me ajudar com os ratinhos.

Aos amigos de laboratório Fabíola Singaretti de Oliveira, Roger Fernandes, Lucas Novaes Teixeira, Larissa Sverzut, Larissa de Castro, Luciana Batista, Alice Dias Petri. Muito obrigada pelos momentos prazerosos de trabalho que vocês me proporcionaram.

Aos amigos de Mestrado Ana Carolina Hawthorne, Gustavo Cavalcanti de Albuquerque, Michel Campos Ribeiro, Marcelo Rodrigues Azenha, Renan de Barros Lima Bueno, Rogério de Biagi Mendes e Patrício José de Oliveira Neto.

À todos os amigos que fiz durante todo período de Especialização e Mestrado, em especial Ana Paula Machado, André Pepato, André Luiz, Fernando Pando, Ana Célia Faria, Hécio Tadeu Ribeiro, Gustavo Eichenberger, Thales Bianchi, Maya Arnez, Cássio Pontes, Antonio José Borin Neto e Juan Carlos Anibal.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho e pela bolsa de mestrado.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho,
MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

*"A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original."*

[Albert Einstein]

*"Tudo tem seu tempo e até certas
manifestações mais vigorosas e originais
entram em voga ou saem de moda. Mas a
sabedoria tem uma vantagem: é eterna."*

[Baltasar Gracián]

Resumo

RESUMO

SICCHIERI, L.G. **Engenharia de tecido ósseo: avaliações *in vitro* e *in vivo* do biomaterial híbrido ácido poli-láctico-co-glicólico/fosfato de cálcio e células osteoblásticas derivadas de células-tronco.** 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Tem sido sugerido que um adequado reparo ósseo pode ser obtido por biomateriais híbridos, produzidos pela combinação de células e materiais substitutos ósseos macroporosos. O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a aplicação do biomaterial híbrido formado pelo arcabouço de PLGA/CaP e células-tronco mesenquimais e osteoblastos derivados de medula óssea na engenharia de tecido ósseo. Para verificar qual o tamanho de poro deste arcabouço é mais adequado para este fim, foram realizados experimentos *in vitro*, que avaliaram a proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e expressão quantitativa de genes marcadores do fenótipo osteoblástico em células cultivadas sobre os arcabouços; e *in vivo*, que avaliaram a formação óssea após implantação do arcabouço em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos. Também foi avaliado o efeito do tamanho dos poros sobre o carreamento celular através da força centrífuga. Para avaliar o efeito do soro fetal bovino, utilizado na suplementação do meio de cultura celular, na resposta tecidual *in vivo*, arcabouços expostos ao soro foram implantados em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos. O efeito da retirada do soro fetal bovino do meio de cultura sobre osteoblastos foi analisado através da proliferação celular, atividade de ALP, conteúdo de proteína total e mineralização. Para avaliar o efeito do estágio de diferenciação celular sobre a formação óssea, células em diferentes estágios de diferenciação osteoblástica associadas ao arcabouço de PLGA/CaP foram implantadas de forma autóloga em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos. Arcabouços com tamanhos de poros de aproximadamente 1000 µm promovem maior diferenciação osteoblástica e melhor carreamento celular, enquanto arcabouços com poros de aproximadamente 500 µm promovem maior formação óssea e vascular *in vivo*. O soro fetal bovino influenciou negativamente a resposta tecidual e a formação óssea. A retirada do soro fetal bovino do meio de cultura reduziu a proliferação celular e a atividade de ALP sem afetar o conteúdo de proteína total e a formação de matriz mineralizada. Células-tronco mesenquimais indiferenciadas e em fase inicial de diferenciação osteoblástica (7 dias) promoveram maior formação óssea, portanto permitiriam a obtenção de um biomaterial híbrido com maior potencial osteogênico.

Palavras-chave: PLGA/CaP, Células osteoprogenitoras, Osteogênese, Engenharia óssea.

Abstract

ABSTRACT

SICCHIERI, L.G. **Bone tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* evaluation of hybrid biomaterial acid poly-lactic-co-glycolic/calcium phosphate and osteoblastic cells derived from stem cells.** 2010. 118 p. Thesis (Master Degree) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

It has been suggested that an adequate bone repair can be obtained by hybrid biomaterials, produced by combining osteoprogenitor cells and macroporous bone substitutes. The aim of this study was to evaluate the application of hybrid biomaterial formed by PLGA/CaP scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells and osteoblasts in bone tissue engineering. The effect of scaffold pore size was evaluated *in vitro* assessing cell growth, alkaline phosphatase (ALP) activity, and quantitative gene expression of osteoblastic phenotype markers in osteoblasts cultured on scaffolds; and *in vivo* assessing bone formation after implantation of scaffolds in critical size rat calvaria defects. It was also evaluated the effect of pore size on cell seeding by centrifugal force. To evaluate the effect of fetal calf serum used to supplement the cell culture medium on *in vivo* tissue response, scaffolds exposed to serum were implanted in critical size rat calvaria defects. The effect of withdrawal of fetal calf serum in the culture medium on osteoblasts was analyzed by cell growth, ALP activity, total protein content and mineralization. To evaluate the effect of cell differentiation stage on bone repair, cells either undifferentiated or in different stages of osteoblast differentiation associated with the PLGA/CaP were implanted autologously in critical size rat calvaria. Scaffolds with pore sizes of around 1000 μm would favor the osteoblast differentiation and display a better cell seeding, while the scaffolds with pore sizes of around 500 μm would favor increased bone and vascular formation. The fetal calf serum influenced negatively the *in vivo* tissue response and bone formation. The withdrawal of fetal calf serum in the culture medium reduced cell growth and ALP activity without affecting the total protein content and the formation of mineralized matrix. Mesenchymal stem cells and osteoblasts at the early stage of differentiation (7 days) promoted greater bone formation, therefore they would allow the obtention of a hybrid biomaterial with higher osteogenic potential.

Keywords: PLGA/CaP, osteoprogenitor cells, osteogenesis, bone engineering.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVO	30
3. CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO DOS POROS DO ARCABOUÇO DE PLGA/CAP NAS RESPOSTAS CELULARES <i>IN VITRO</i> E TECIDUAIS <i>IN VIVO</i>.....	32
3.1 OBJETIVO	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.2.1. Confeção do arcabouço de PLGA/CaP	32
3.2.2 Experimentos <i>in vitro</i>	33
3.2.2.1 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais	33
3.2.2.1.1 Proliferação celular.....	35
3.2.2.1.2 Atividade de fosfatase alcalina	36
3.2.2.1.3 Análise da expressão gênica	37
3.2.2.1.3.1 Extração de RNA total para PCR em tempo real	37
3.2.2.1.3.2 Síntese da fita de cDNA	39
3.2.2.1.3.3 Reações de PCR em tempo real.....	39
3.2.3 Experimentos <i>in vivo</i>	42
3.2.3.1 Grupos e tempos experimentais.....	42
3.2.3.2 Procedimento cirúrgico	42
3.2.3.3 Processamento e análise histológica.....	44
3.2.4 Análise estatística	46
3.3 RESULTADOS	47
3.3.1 Arcabouço de PLGA/CaP.....	47
3.3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	48
3.3.2.1 Avaliação das respostas celulares.....	48
3.3.2.1.1 Proliferação celular.....	48
3.3.2.1.2 Atividade de ALP	49
3.3.2.1.3 Análise da expressão gênica	49
3.3.3 Experimentos <i>in vivo</i>	51
3.4 DISCUSSÃO	56
3.5 CONCLUSÕES	59

4. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO DOS POROS DO ARCABOUÇO DE PLGA/CAP NO CARREAMENTO DE CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS.....	61
4.1 OBJETIVO	61
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.2.1 Confeção do arcabouço de PLGA/CaP.....	61
4.2.2 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais	62
4.2.3 Carreamento das células	62
4.2.4 Análise estatística	63
4.3 RESULTADOS	64
4.4 DISCUSSÃO	66
4.5 CONCLUSÃO.....	68
 5. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO INCORPORADO AOS ARCABOUÇOS DE PLGA/CAP NA FORMAÇÃO ÓSSEA IN VIVO	70
5.1 OBJETIVO	70
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
5.2.1 Confeção do arcabouço de PLGA/CaP.....	70
5.2.2 Grupos experimentais.....	71
5.2.3 Procedimento cirúrgico.....	71
5.2.4 Processamento e análise histológica.....	72
5.2.5 Análise estatística	72
5.3 RESULTADOS	73
5.4 DISCUSSÃO	76
5.5 CONCLUSÃO.....	77
 6. CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES APÓS A REMOÇÃO DO SORO FETAL BOVINO DO MEIO DE CULTURA	79
6.1 OBJETIVO	79
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
6.2.1 Grupos experimentais.....	79
6.2.2 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais	80
6.2.2.1 Proliferação celular.....	80
6.2.2.2 Conteúdo de proteína total.....	81

6.2.2.3 Atividade de fosfatase alcalina.....	81
6.2.2.4 Formação de matriz mineralizada.....	82
6.2.3 Análise estatística	83
6.3 RESULTADOS	84
6.3.1 Avaliação das respostas celulares.....	84
6.3.1.1 Proliferação celular.....	84
6.3.1.2 Conteúdo de proteína total.....	85
6.3.1.3 Fosfatase alcalina.....	86
6.3.1.4 Formação de matriz mineralizada.....	87
6.4 DISCUSSÃO	88
6.5 CONCLUSÃO.....	89
 7. CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTÁGIO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO ÓSSEO.....	 91
7.1 OBJETIVO	91
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	91
7.2.1 Confeção do arcabouço de PLGA/CaP.....	91
7.2.2 Grupos experimentais.....	92
7.2.3 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais indiferenciadas e diferenciadas em osteoblastos	92
7.2.4 Carreamento das células	95
7.2.5 Procedimento cirúrgico.....	95
7.2.6 Processamento e análise histológica.....	95
7.2.7 Análise estatística	96
7.3 RESULTADOS	97
7.4 DISCUSSÃO	102
7.5 CONCLUSÃO.....	104
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 106

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área de pesquisa associada à medicina regenerativa e tem sido definida como a aplicação de princípios e técnicas das ciências biológicas e da engenharia para o desenho, a construção e o crescimento de tecidos vivos utilizando biomateriais, células e fatores de crescimento, isoladamente ou em combinação (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002; SITTINGER et al., 1996; LANGER; VACANTI, 1993). Para produção de um novo tecido, três aspectos gerais são considerados: células ou substitutos celulares, arcabouços tridimensionais 3D e compostos que possam estimular o tecido, como fatores de crescimentos (ROSA et al., 2008). Tal técnica tem sido aplicada na reconstrução de diversos tipos de tecidos e órgãos como pele, vasos sanguíneos, nervos, tecido cardíaco, bexiga, traquéia e osso (TENG et al., 2002; KAUSHAL et al., 2001; ISHAUG-RILEY et al., 1998; SABOLINSKI et al., 1996). Quando aplicada no tecido ósseo é chamada de engenharia de tecido ósseo.

A combinação de células do próprio paciente com arcabouços porosos para produzir biomateriais osteogênicos 3D híbridos é um tema comum de investigação em engenharia de tecido ósseo (DE BRUIJN et al., 1999; GOSHIMA et al., 1991; ANSELME et al., 1999; OHGUSHI et al., 1990). A maioria dos estudos está focada na fabricação de arcabouços porosos e na seleção das células a serem utilizadas (MAO et al., 2005). Arcabouços para serem empregados em engenharia de tecido ósseo deveriam ser 3D, biocompatíveis, absorvíveis, osseocondutivos e mecanicamente estáveis (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005; LANGER; VACANTI, 1993). Além disso, a arquitetura dos arcabouços deveria apresentar uma macroporosidade interconectada suficiente para permitir a colonização de toda a superfície 3D por células e tecidos (GUAN; DAVIES, 2004).

Até o presente momento, os biomateriais que tem sido avaliados como potenciais arcabouços para serem utilizados em engenharia de tecido ósseo incluem: metais como titânio; materiais sintéticos orgânicos incluindo polímeros e co-polímeros; materiais sintéticos inorgânicos como hidroxiapatita e compósitos de fosfato de cálcio; materiais naturais orgânicos como colágeno, ácido hialurônico e quitosana; e materiais inorgânicos naturais como a hidroxiapatita coralina (WIESMANN et al., 2004).

Dentre os polímeros sintéticos que tem sido utilizados para a produção de substratos para engenharia de tecido ósseo, o arcabouço do polímero biodegradável ácido polilático-co-glicólico (PLGA) foi desenvolvido com geometria e dimensões de poros que mimetizam a arquitetura do osso trabecular humano (HOLY et al., 2003). Visando melhorar suas propriedades mecânicas por aumentar sua estabilidade mecânica e as propriedades biológicas por torná-lo osteocondutivo e biodegradável, um novo arcabouço foi produzido, associando fosfato de cálcio (CaP) ao PLGA, originando o compósito PLGA/CaP (GUAN; DAVIES, 2004). A este compósito, foi adicionado um revestimento de CaP, que melhora a biocompatibilidade do arcabouço e evita uma resposta inflamatória crônica (LICKORSH et al., 2007). Sendo assim, este compósito de PLGA/CaP pode representar um arcabouço adequado para a produção de biomaterial híbrido para ser empregado em engenharia de tecido ósseo.

A presença de poros interconectados na estrutura do arcabouço é essencial para a formação óssea, pois permite a colonização, crescimento e diferenciação de células, a invaginação dos tecidos adjacentes, formação vascular e fluxo de sangue e nutrientes no interior do arcabouço. O tamanho dos poros pode influenciar a infiltração celular e a vascularização do tecido, interferindo no processo de reparação óssea (BOYAN et al., 1996a; BOYAN et al., 1996b; HARLEY et al., 2008). Se os poros são muito pequenos, a migração celular será limitada, resultando na formação de uma cápsula celular fibrosa ao redor das

extremidades do arcabouço, que podem limitar a difusão de nutrientes e remoção de resíduos, resultando em áreas de necrose. Arcabouços com tamanhos de poros que variam de 20 μm a 1500 μm foram utilizados em aplicações de engenharia de tecido ósseo (BAKSH et al., 1998; LEE et al., 2004; NEHRER et al., 1997; PILLIAR et al., 1986; WILLIAMS et al., 2005). Muitos estudos têm sugerido a necessidade de poros maiores que 300 μm para a vascularização e formação óssea no arcabouço. Ao facilitar a formação de vasos capilares, poros maiores que 300 μm permitem a osteogênese direta, enquanto que poros menores que 300 μm estimulam a ossificação osteocondral (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005; KUBOKI et al., 2001; ROOSA et al., 2010; TSURUGA et al., 1997). No entanto, é importante identificar os limites do tamanho dos poros, poros muito grandes podem afetar as propriedades mecânicas dos arcabouços, aumentando o volume vazio (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005).

Originalmente o compósito PLGA/CaP foi desenvolvido com uma porosidade interconectada de 85% e poros variando de 850 a 1200 μm , que mimetizam a arquitetura do osso trabecular humano (LICKORISH et al., 2007). No entanto, considerando que é essencial manter o equilíbrio entre o tamanho ideal dos poros do arcabouço para a migração celular e a área de superfície necessária para a adesão das células (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005); e ainda que, o tamanho dos poros pode afetar a vascularização e, conseqüentemente, a infiltração celular e tecidual, o que interferiria no processo de reparo ósseo (BOYAN et al., 1996a; BOYAN et al., 1996b; HARLEY et al., 2008). Dessa forma, é importante avaliar o efeito do tamanho dos poros nas respostas celulares e teciduais elicitadas pelos arcabouços, bem como, seu efeito no carreamento de células para os mesmos. Esses estudos foram realizados por meio de experimentos *in vitro*, *in vivo* (capítulo 1) e de carreamento celular (capítulo 2).

Outro aspecto que tem merecido bastante atenção na área de engenharia de tecido ósseo refere-se a quais células devem ser utilizadas, principalmente se células indiferenciadas com potencial para adquirir o fenótipo osteoblástico sob estímulos adequados ou se células da linhagem osteoblástica. De acordo com Handschel et al. (2006), três grupos distintos de células podem ser determinados com relação à capacidade de diferenciação: células irrestritas capazes de diferenciação para todos ou a maioria dos tipos celulares (células-tronco embrionárias); células mesenquimais progenitoras multipotentes que adquirem fenótipo específico dependendo do seu estágio de maturação (células-tronco multipotentes derivadas de medula óssea); e células diferenciadas (da linhagem osteoblástica, incluindo osteoblastos).

Considerando a origem, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias, fetais e adultas. As células embrionárias apresentam maior plasticidade e são pluripotentes, podendo se diferenciar em qualquer tipo celular do embrião em estágios iniciais de desenvolvimento (XU et al., 2002). Dois principais desafios estão relacionados ao uso de células-tronco embrionárias: reações imunológicas e formações tumorais após cultura e transplante.

Dentre os diferentes tipos de células-tronco adultas, as mais estudadas são as células mesenquimais multipotentes derivadas da medula óssea, primeiramente demonstrada por Friedenstein et al. (1968) e posteriormente caracterizada por outros autores (ASHTON et al., 1980; BERESFORD, 1989). Considerando que estas células podem ser facilmente obtidas por aspiração da medula óssea do mesmo paciente que posteriormente receberá o transplante do tecido fabricado, a possibilidade de rejeição é bastante reduzida. Portanto, cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea pode ser uma fonte de células osteoprogenitoras capazes de promover o reparo de defeitos ósseos quando futuramente utilizadas como terapia celular.

Essas células apresentam capacidade de adesão ao substrato, poliestireno, e se distinguem de células hematopoiéticas e macrófagos por características morfológicas e bioquímicas (FRIEDENSTEIN, 1980). Células mesenquimais em cultura mantêm características de células-tronco, ou seja, são capazes de proliferar e diferenciar em células de diversos tecidos, como, osteoblastos, condrócitos e adipócitos (LEBOY et al., 1991; LANOTTE et al., 1982; ASHTON et al., 1980). Tem sido demonstrado que estas células possuem potencial osteogênico, ou seja, quando cultivadas em meio osteogênico, são capazes de adquirir fenótipo osteoblástico caracterizado por três fases distintas que são definidos por: proliferação; produção e maturação da matriz extracelular; e mineralização da matriz (BECK, 2003), sendo assim, estas células poderiam ser empregadas em estudos de engenharia de tecido ósseo (BELOTI et al., 2008a; BELOTI et al., 2005).

Alguns estudos têm mostrado que células-tronco mesenquimais de medula óssea quando cultivadas sobre arcabouços 3D, como esponjas de gelatina, apresentam melhor capacidade osteogênica quando comparados ao uso do arcabouço sem células (SROUJI; LIVNE, 2005; SCHANTZ et al., 2003; KREBSBACH et al., 1998). Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório indicam que carrear células para os arcabouços de PLGA/CaP e mantê-los em meio de cultura, resulta na exposição do arcabouço às proteínas presentes no soro fetal bovino, o que impede a formação de tecido *in vivo* (BELOTI ET AL., 2008b). Nossa hipótese é de que isso se deveria à adsorção de proteínas presentes no soro fetal bovino, que suplementa o meio de cultura, ao arcabouço quando mantido em cultura por períodos de até 14 dias. Para testar esta hipótese foram realizados experimentos *in vivo* com arcabouços mantidos em diferentes soluções com ou sem soro fetal bovino, porém na ausência de células (capítulo 3).

Estando nossa hipótese correta, mesmo não mantendo os arcabouços em meio de cultura, restaria o fato de que as células que são carreadas para os mesmos são

necessariamente cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino. Sendo assim, tornou-se necessária a remoção do soro fetal bovino do meio de cultura e cultivar as células em meio não suplementado previamente ao carreamento e implantação do arcabouço com células. Para tanto, foi necessário desenvolvermos um experimento com o objetivo de avaliar o efeito da retirada do soro fetal bovino do meio de cultura sobre essas células (capítulo 4).

A partir dos resultados sobre a influência do efeito do tamanho dos poros nas respostas celulares e teciduais e no carreamento de células, e dos resultados pertinentes aos estudos sobre o soro fetal bovino, foi possível realizar estudos para verificar a influência do estágio de diferenciação celular na resposta tecidual *in vivo*. Portanto, foram desenvolvidos estudos para verificar se o período de cultivo *in vitro*, ou seja, a fase de diferenciação osteoblástica destas células quando associadas ao arcabouço de PLGA/CaP influencia na resposta tecidual *in vivo* durante o reparo ósseo (capítulo 5).

Objetivo

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a aplicação do biomaterial híbrido formado pela combinação do arcabouço de PLGA/CaP com células derivadas de medula óssea na engenharia de tecido ósseo.

Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- O efeito do tamanho dos poros do arcabouço de PLGA/CaP nas respostas celulares *in vitro* e na formação óssea *in vivo*, bem como na capacidade de carregamento de células para os arcabouços.
- O efeito da adsorção de proteínas do soro fetal bovino, utilizado na suplementação do meio de cultura de células, aos arcabouços de PLGA/CaP na formação óssea *in vivo*.
- O efeito da retirada do soro fetal bovino sobre as células derivadas de medula óssea.
- O efeito do estágio de diferenciação celular sobre a formação óssea em biomateriais híbridos formado pela combinação de PLGA/CaP com células derivadas de medula óssea.

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO
DOS POROS DO ARCABOUÇO DE
PLGA/CAP NAS RESPOSTAS CELULARES
IN VITRO E TECIDUAIS *IN VIVO*

3. CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO DOS POROS DO ARCABOUÇO DE PLGA/CAP NAS RESPOSTAS CELULARES *IN VITRO* E TECIDUAIS *IN VIVO*

3.1 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do diâmetro dos poros do arcabouço de PLGA/CaP nas respostas celulares *in vitro* utilizando culturas de osteoblastos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea, e teciduais *in vivo* em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos Wistar.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Confeção do arcabouço de PLGA/CaP

Os arcabouços de PLGA/CaP foram preparados pelo Professor John E. Davies do *Institute for Biomaterials and Biomedical Engineering (University of Toronto, Canadá)* como descrito previamente por Guan e Davies (2004) e Lickorish et al. (2007).

Foram preparados arcabouços com 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura para experimentos *in vitro*, e arcabouços com 5mm de diâmetro e 2 mm de altura para experimentos *in vivo*.

A porosidade de 85% foi mantida em todos os arcabouços e os poros apresentaram diâmetros diferentes: variando entre 470-590 μm (S1), entre 590-850 μm (S2) e entre 850-1200 μm (S3).

3.2.2 Experimentos *in vitro*

3.2.2.1 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais foram obtidas de medula óssea de fêmures de ratos Wistar com 4 semanas de idade e com peso corporal entre 100 e 150 g, como descrito por Maniatopoulos et al. (1988). Os ratos foram mortos com excesso de anestésico Ketamina (Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Dopaser – Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil). Os fêmures foram retirados e transportados até o laboratório em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM – Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 500 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Gibco) e 3 $\mu\text{g/ml}$ de fungisone (Gibco). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à anti-sepsia e remoção de tecidos moles restantes. As epífises foram cortadas e a medula óssea foi extraída do fêmur por meio de irrigação com meio de cultura (Figura 1).

Figura 1 – Extração da medula óssea de fêmur de rato Wistar para cultura de células-tronco mesenquimais. A - Fêmur após remoção dos tecidos moles e anti-sepsia. B - Secção das epífises para extração da medula. C- Extração da medula óssea por meio de irrigação com meio de cultura.

As células em cultura primária foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, Costar, Corning, NY, EUA) e diferenciadas em osteoblastos através de meio de cultura osteogênico na seguinte composição: α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/ml de vancomicina (Acros Organics, Gell, Bélgica), 0,3 μ g/ml de fungizona (Gibco), 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco), 5 μ g/ml de ácido ascórbico (Gibco), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma). Esse meio permite a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (ROSA; BELOTI, 2003a; ROSA; BELOTI, 2003b; BELOTI; ROSA, 2005). As células foram cultivadas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 3 ou 4 dias.

Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e a solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 1,3 mg/ml de collagenase do tipo II (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) foi adicionada para obtenção de suspensão de células. Essas células foram subcultivadas na concentração de 2×10^4 células/disco de PLGA/CaP sobre as amostras S1, S2 e S3 colocadas em poços de placas de 24 poços. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

3.2.2.1.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de subcultura pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). Esse ensaio é dependente da redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis em um produto azul em forma de cristais (formazan) (MOSMANN, 1983). A quantidade desses cristais é diretamente proporcional à coloração azul formada ao final da reação que, avaliada por um espectrofotômetro, permite uma estimativa do número de células viáveis na cultura.

Alíquotas de MTT foram preparadas em solução PBS (do inglês *Phosphate-buffered saline*, Gibco) na concentração de 5 mg/ml. Após a lavagem das amostras com PBS aquecida a 37°C, as células foram incubadas com 10% da solução de MTT em meio de cultura (100 µl da solução de MTT e 900 µl de meio) por 4 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, os sobrenadantes foram aspirados e as amostras lavadas com 1 ml de solução PBS aquecida. Em seguida, foi adicionado 1 ml da solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol) em cada amostra sob agitação por 5 minutos, para solubilização completa do precipitado de cristais formado. Alíquotas de 200 µl foram retiradas das amostras solubilizadas e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm com correção em 650 nm (IKENOUE et al., 1999). A proliferação celular foi expressa como densidade óptica.

3.2.2.1.2 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (ALP, do inglês *alkaline phosphatase*) foi avaliada aos 10 dias de subcultura por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, usando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

O meio de cultura foi removido e as amostras lavadas três vezes com PBS aquecida a 37°C. A seguir, os poços foram preenchidos com 2 ml de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choque térmico, que consistiram na exposição da placa em ambiente a -20°C por 20 minutos, seguida de 15 minutos a 37°C. Isso resulta na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água deionizada. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes, sendo os tubos testes um para cada amostra. Em todos os tubos foram adicionados 50 µl de substrato e 500 µl de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/ml, pH 10,1. No tubo padrão foi acrescentado 50 µl da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 50 µl dos lisados celulares e os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes 2 ml do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 µmol/ml e NaOH 0,25 µmol/ml). Em seguida, a absorbância foi avaliada em espectrofotômetro (CE 3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm. Os valores de absorbância foram normalizados pela proliferação celular e expressos como atividade de ALP.

3.2.2.1.3 Análise da expressão gênica

Aos 10 dias de subcultura, o RNA total das células foi extraído para avaliação da expressão quantitativa dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico: *runt related factor 2* (RUNX2), ALP, colágeno tipo I (COL-I), osteocalcina (OC), sialoproteína óssea (BSP), Msh homeo box homólogo 2 (MSX2) e osterix - fator de transcrição zinc finger (OSX), por reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*) em tempo real. Como controle foi avaliada a expressão do gene constitutivo *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido). As seqüências dos *primers* e as características da reação são apresentadas na Tabela 1.

3.2.2.1.3.1 Extração de RNA total para PCR em tempo real

A extração do RNA total das células foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguido do tratamento com DNase (Promega, Madison, WI, EUA), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, após a remoção do meio de cultura, as células foram lisadas com 1 ml do reagente Trizol LS (Invitrogen) no primeiro poço de cada uma das amostras permanecendo à temperatura ambiente por 5 minutos, sob agitação por pipetagem. A fim de se obter uma quantidade de RNA suficiente para realização dos experimentos, a suspensão foi transferida para o poço seguinte da placa contendo a mesma amostra e assim sucessivamente, constituindo um *pool* de RNA correspondente a 10 poços para cada um dos grupos experimentais. Os lisados foram transferidos para tubos *ependorf* (1,5 ml) e armazenados em freezer a -20°C por 48 h. A

seguir, foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Sigma) para cada 1 ml da suspensão de lisados. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos, e logo após, mantidos em repouso a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo *eppendorf* (1,5 ml) e mantidas refrigeradas.

Após a coleta da fase aquosa determinada pela adição do clorofórmio, o RNA foi precipitado com isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) gelado, na mesma proporção da fase aquosa (v/v). As amostras foram mantidas a -20°C por 24 h e posteriormente centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Para obtenção dos precipitados, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* lavado com 1 ml de etanol a 75% (Merck) e centrifugados a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Essa etapa de lavagem e centrifugação foi repetida por duas vezes. A seguir, as amostras foram deixadas por 5 minutos em banho de gelo para evaporação do excesso de etanol. Os precipitados formados foram dissolvidos em 13 µl de água Mili-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC - Sigma) e estocados em freezer a -80°C. Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 3 µl foi diluída em 297 µl de água previamente tratada com DEPC e analisada por espectrofotometria em aparelho Biomate 3 Spectrophotometer Thermospectronic (Rochester, NY, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/µl e contaminação por fenol ou proteínas. Para o preparo da água adicionou-se 1 ml de DEPC em 999 ml de água deionizada, sendo essa mistura incubada por 24 horas e autoclavada por 30 minutos a 120 mmHg.

Em seguida, 3 µg de RNA foi submetido ao tratamento com DNase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Para isso, foram adicionados à amostra 1 µl de tampão, 1 unidade de DNase livre de RNase, e o volume foi ajustado em 10 µl com água DEPC. A amostra foi submetida a 37°C por 1 hora no termociclador. O RNA foi novamente

quantificado e 1 µg foi utilizado para a confecção do DNA complementar (cDNA) e 2 µg para o gel de agarose para avaliação da integridade da amostra.

3.2.2.1.3.2 Síntese da fita de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa (*High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits*, Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: 2 µl de tampão 10x, 0,8 µl do mix de dNTP 100 mM, 2 µl de *random primer*, 1 µl de inibidor de RNase, 1 µl da enzima Transcriptase Reversa e 3,2 µl de água livre de nuclease. Em seguida, a amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 segundos e mantida a 4°C. Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA foi estocado em freezer -20°C.

3.2.2.1.3.3 Reações de PCR em tempo real

Para realização do PCR em tempo real foi utilizado o sistema SYBR *Green*, em um aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Foram utilizados 7 µl do reagente SYBR *Green Master Mix* (Applied Biosystems) que contém o fluoróforo SYBR *Green 1*, a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão, 2,5 µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 2,5 µl de água Mili-Q tratada com DEPC, e 0,5 µl da solução contendo cada *primer* com as concentrações adequadas.

A reação de amplificação compreendeu 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct do inglês *cycle threshold*),

Tabela 1 - Sequências de *primers* e propriedades da reação.

Gene	Sequência <i>Sense</i> e <i>anti-sense</i>	TA (°C)	TM (°C)	Bp
GAPDH	AAATGCTTCTAGGCGGACTG GGTTTTGTCAAAGAAAGGGTG	58	78	60
RUNX2	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA	56	77	137
ALP	CCAACTCATTGTGCCAGAG CAGGGCATTTCCTCAAGGTCTC	57	74	75
COL-I	CCAACGAGATCGAGCTCAGG GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC	61	83	113
OC	GCAGACACCATGAGGACCCT CCGGAGTCTATTCACCACCTTACTG	61	83	153
BSP	CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT GCTAGCGGTTACCCCTGAGA	59	81	202
MSX2	GAAACAGTACCTCTCCATCGCAGAG TTTGGCAGCCATTTTCAGCT	59	81	151
OSX	CAAGAGTCGGATTCTAGGATTGGAT CAAACCTTGCTGCAGGCTGCT	62	84	208

*GAPDH - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; RUNX2 – *runt related factor 2*; ALP – fosfatase alcalina; COL-I – colágeno tipo 1 alfa I; OC – osteocalcina; BSP – sialoproteína óssea; MSX2 - Msh homeo box homolog 2; OSX – osterix-fator de transcrição zinc finger; TA – Temperatura de anelamento; TM – Temperatura de desnaturação; Bp – número de pares de base do produto.

3.2.3 Experimentos *in vivo*

3.2.3.1 Grupos e tempos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar com quatro semanas de idade e peso corporal variando entre 120 e 150g divididos em três grupos experimentais: S1, S2 e S3, de acordo com a variação do tamanho de poros dos arcabouços. Os grupos foram avaliados em três tempos experimentais: 2, 4 e 8 semanas de implantação, totalizando 24 animais.

3.2.3.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à cirurgia para preparação de defeitos ósseos críticos bilaterais em calvária com diâmetro de 5 mm. Para isso, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (7mg/100g de peso corporal) (Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina (0,6 mg/100g de peso corporal) (Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil). administrado por via intraperitoneal. Após tricotomia e anti-sepsia com povidina-iodo alcoólica (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi descolado e os defeitos produzidos bilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico. Os defeitos ósseos foram preenchidos com os arcabouços de PLGA/CaP de forma aleatória, sendo que cada rato recebeu 2 amostras diferentes do arcabouço. Após o preenchimento dos defeitos, a pele foi suturada com mononylon 3.0 (Ethicon Ltd., São Paulo, São Paulo, Brasil) e a ferida cirúrgica, lavada com solução de povidina-iodo alcoólica

(Rioquímica) (Figura 2). Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinina meglumina (10mg/100g de peso corporal) (Banamine, Schering-Plough, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65mg/100g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65mg/100g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brazil).

Figura 2 – Implantação do arcabouço de PLGA/CaP. A - Anti-sepsia da pele com povidina-iodo alcoólica. B - exposição da calvária após incisão da pele e tecido subcutâneo. C - confecção dos defeitos ósseos críticos bilaterais com 5 mm de diâmetro. D - Implantação do arcabouço de PLGA/CaP em um dos defeitos. E - Sutura em pele com mononylon 3.0.

Ao final de cada tempo experimental os animais foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilasina (Dopaser – Calier) e as calvárias contendo as amostras foram removidas para posterior processamento histológico.

3.2.3.3 Processamento e análise histológica

As calvárias contendo amostras do arcabouço de PLGA/CaP foram fixadas em solução de formalina 10%, pH 7,0 à temperatura ambiente, por 36 horas. Após fixação, as peças foram descalcificadas com solução de EDTA tamponada (Merck, Darmstadt, Germany), a temperatura ambiente por 10 dias, seguida por desidratação em concentrações crescentes de álcool (80%, 90%, 96% e 100%), permanecendo por 2 horas em cada concentração. Ao final da desidratação, permaneceram de um dia para o outro em álcool-xilol (50% - álcool absoluto e 50% - Xilol PA) e foram diafanizadas com duas passagens em Xilol PA, permanecendo por 2 horas em cada passagem. Após a diafanização, as peças passaram pelo processo de inclusão em parafina, que consiste em dois banhos de parafina PA por 1 hora cada banho e a inclusão utilizando forma de papel e parafina PA, conforme protocolo de rotina.

Após inclusão das peças, foram realizados os cortes histológicos das amostras com 6 µm de espessura que foram corados com Hematoxilina e Eosina. Foram realizados 30 cortes semi-seriados para cada amostra, aproximadamente até metade do biomaterial implantado, a fim de observar o reparo na região mais central do defeito ósseo crítico. Foram selecionados para análise três dos nove últimos cortes realizados.

A análise histológica e histomorfométrica foi realizada a partir de imagens adquiridas dos cortes histológicos selecionados, obtidas por microscopia de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha), captadas por câmera digital (Axiocam ICc3, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio e processadas com o software *Axion Vision*. Foram adquiridas 5 ou 6 imagens para cada região onde o biomaterial foi implantado, totalizando 10 a 12 imagens para cada corte histológico analisado, de forma que foram adquiridas imagens ao longo de todo diâmetro do defeito ósseo bilateralmente (Figura 3). Um retículo contendo 204 pontos equidistantes foi sobreposto à imagem adquirida utilizando o *software Adobe Photoshop*

versão 8.0.1 (Figura 4). A formação óssea foi avaliada por meio da contagem dos pontos sobrepostos ao tecido ósseo formado.

Nesses mesmos cortes histológicos, foi feita contagem do número total de vasos sanguíneos.

Figura 3 - Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos bilaterais com arcabouço de PLGA/CaP. Os retângulos evidenciam as imagens que foram adquiridas para cada corte histológico. (H.E. 1x)

Figura 4 – Fotomicrografia mostrando defeito crítico de calvária de rato preenchido pelo arcabouço de PLGA/CaP com a sobreposição do retículo contendo 204 pontos para a análise histomorfométrica. (H.E. 10x).

3.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos relativos às análises das respostas celulares *in vitro* e relativos à formação óssea e número de vasos sanguíneos *in vivo* foram analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Fischer através do software GMC versão 2002. Coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para análise da correlação entre a expressão gênica e o tamanho dos poros dos arcabouços. O nível de significância foi de 5%.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Arcabouço de PLGA/CaP

Os arcabouços de PLGA/CaP apresentaram uma estrutura com macroporos altamente interconectados com 85% de porosidade e três variações de diâmetro dos poros: S1 (470-590 μm), S2 (590-850 μm) e S3 (850-1200 μm), conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Arcabouços de PLGA/CaP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros: S1 (470-590 μm), S2 (590-850 μm) e S3 (850-1200 μm). Imagens macroscópicas: A, B e C (barra = 2 mm). Imagens em microscopia eletrônica de varredura: D, E e F (barra = 400 μm)

3.3.2 Experimentos *in vitro*

3.3.2.1 Avaliação das respostas celulares

3.3.2.1.1 Proliferação celular

Ocorreu proliferação celular em todos os arcabouços de PLGA/CaP no período de 3 a 10 dias. Apesar do arcabouço S3 apresentar uma densidade óptica ligeiramente inferior, principalmente aos 10 dias, não houve diferença na proliferação e viabilidade celular entre os arcabouços com relação ao tamanho dos poros em qualquer período avaliado (Figura 6).

Figura 6 – Proliferação celular de osteoblastos cultivados sob arcabouços de PLGA/CaP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros, expressa como densidade óptica, avaliada aos 3, 7 e 10 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 5).

3.3.2.1.2 Atividade de ALP

A atividade de ALP avaliada aos 10 dias de subcultura não foi influenciada pelo tamanho dos poros dos arcabouços (Figura 7).

Figura 7 – Atividade de ALP de osteoblastos cultivados sob arcabouços de PLGA/CaP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros, avaliada aos 10 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 5).

3.3.2.1.3 Análise da expressão gênica

As células cultivadas sobre os arcabouços S3 por 10 dias apresentaram maior expressão gênica para RUNX2, ALP, OC, BSP e MSX2 quando comparados às crescidas sobre S1 e S2 ($p=0,01$). Assim como, as células cultivadas sobre S2 apresentaram maior expressão para todos os genes quando comparada com aquelas cultivadas sobre S1 ($p=0,05$). O RNAm para COL também foi mais expresso nas células crescidas em arcabouço S3 ($p=0,05$), porém não houve diferença entre os arcabouços S2 e S1. OSX foi menos expresso nas células crescidas em arcabouço S1 ($p=0,01$), porém não houve diferença entre os

arcabouços S2 e S3 (Figura 8). Houve uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o tamanho dos poros e expressão gênica para todos os genes avaliados com exceção do OSX que apresentou uma fraca correlação (Tabela 2).

Figura 8 – Expressão de genes marcadores de fenótipo osteoblástico em osteoblastos cultivados sobre o arcabouço de PLGA/CaP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros, avaliada aos 10 dias de subcultura. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo GAPDH. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 3). Os * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p = 0,05$ e $p = 0,01$ respectivamente.

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Pearson entre expressão gênica e diâmetro do poro.

Gene	Coeficiente de correlação de Pearson	Valores de p
RUNX2	0.97	0.0002
ALP	0.96	0.0002
COL	0.84	0.0048
OC	0.93	0.0006
BSP	0.99	<0.0001
MSX2	0.92	0.0006
OSX	0.65	0.057

3.3.3 Experimentos *in vivo*

Independentemente do diâmetro dos poros ou tempo de implantação, houve formação óssea em todos os arcabouços (Figura 9). Nos períodos iniciais, foi observado tecido ósseo em íntimo contato com o arcabouço, caracterizado pela presença de lacunas de osteócitos e revestido por osteoblastos ativos em contato com o tecido ósseo mineralizado. Em algumas áreas, uma linha de cimentação foi observada entre as paredes dos arcabouços e o tecido ósseo (Figura 10). Após 8 semanas de implantação, foi possível observar osso lamelar e osso imaturo na mesma área e presença de células de revestimento (Figura 10). No entanto, em algumas áreas, observou-se a presença de esporádicas células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço, mesmo após oito semanas de implantação. (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP com três variações de diâmetro dos poros: S1 - 470-590 μm (A, D, G); S2 - 590-850 μm (B, E, H); S3 - 850-1200 μm (C, F, I). (AC) 2 semanas pós-implantação; (DF) 4 semanas pós-implantação; (GI), 8 semanas pós-implantação. S indica o arcabouço de PLGA/CaP ; * indica tecido ósseo formado. Barra = 200 μm . H.E.

Figura 10 – Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP, evidenciando características comuns entre os grupos. A - 2 semanas pós-implantação, **S** indica arcabouço de PLGA/CaP com o tamanho dos poros de 590-850 μm , **wb** indica formação de tecido ósseo imaturo, $\blacktriangleright$ indica linha de osteoblastos ativos em contato com o tecido ósseo; $\blacktriangle$ indica linha de cimentação na superfície do osso em contato com o arcabouço. B - 4 semanas pós-implantação, **S** indica o arcabouço de PLGA/CaP com tamanho dos poros de 590-850 μm ; $\blacktriangleright$ indicam células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço. C - 4 semanas pós-implantação, **S** indica o arcabouço de PLGA/CaP com tamanho dos poros de 470-590 μm , * indicam vasos sanguíneos. D - 8 semanas pós-implantação, **S** indica o arcabouço de PLGA/CaP com tamanho dos poros de 590-850 μm ; **wb** indica formação de tecido ósseo imaturo; **lb** indica osso lamelar formado a partir de osso imaturo inicialmente formado; $\blacktriangle$ indica linha de cimentação entre o osso imaturo e o osso lamelar, $\blacktriangleright$ indica células de revestimento em contato com osso lamelar. Barras: A, B, D = 50 μm ; C = 100 μm . H.E.

A análise histomorfométrica mostrou que a quantidade de tecido ósseo aumentou ao longo do tempo de implantação, notadamente para arcabouços S1 nos períodos de 4 e 8 semanas. Ao final de 2 semanas, uma pequena quantidade de tecido ósseo foi detectada em todos os arcabouços, sem qualquer diferença em relação ao diâmetro dos poros. No entanto, após 4 e 8 semanas S1 apresentou uma quantidade estatisticamente significante maior de formação óssea em comparação com S2 e S3 ($p=0,01$ e $p=0,001$ respectivamente). Apesar da maior formação óssea verificada em S2, não houve diferença estatisticamente significante entre S2 e S3 (Figura 11). O número de vasos sanguíneos apresentou um padrão semelhante, sem qualquer diferença entre os arcabouços em 2 semanas, mas com aumento estatisticamente significante na quantidade de vasos em S1 nos períodos de 4 e 8 semanas (Figura 12).

Figura 11 - Formação óssea nos arcabouços de PLGA/CAP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros, implantado em defeitos ósseos críticos bilaterais, avaliados em 2, 4 e 8 semanas de reparo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($N = 5$). O * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p=0,01$ e $p=0,001$.

Figura 12 – Número de vasos sanguíneos nos arcabouços de PLGA/CAP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros, implantado em defeitos ósseos críticos bilaterais, avaliados em 2, 4 e 8 semanas de reparo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (N = 5). O *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa para $p = 0,05$, $p = 0,01$ e $p = 0,001$ respectivamente.

3.4 DISCUSSÃO

Há vários relatos sobre a importância da porosidade, o tamanho dos poros, a interconectividade, a composição química e as propriedades mecânicas no comportamento biológico de arcabouços utilizados em engenharia de tecido ósseo (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005; HUTMACHER et al., 2007; KIM et al., 2010). No entanto, há pouco consenso sobre a porosidade ideal e o tamanho dos poros que os arcabouços têm que apresentar para cumprir as propriedades requeridas. Parece que porosidade acima de 65% favorece uma maior calcificação *in vivo* (KASTEN et al., 2008) e que poros de tamanho acima de 300 μm são necessários para a vascularização dos arcabouços e formação óssea (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005; KUBOKI et al., 2001; ROOSA et al., 2010; TSURUGA et al., 1997). Poros menores resultariam em ossificação endocondral, enquanto poros superiores a 500 μm permitiriam maior formação óssea (HUTMACHER et al., 2007; LICKORISH et al., 2004). Gauthier et al. (1998) relataram que o tamanho dos poros é mais importante para a formação óssea que a porosidade.

Neste estudo optamos por avaliar o efeito do tamanho de poros nas respostas celulares e na formação óssea em arcabouços apresentando diversos tamanhos de poros. Foram avaliados arcabouços que mimetizam o osso trabecular, apresentando poros maiores variando entre 850-1200 μm (LICKORISH et al., 2007), arcabouços com poros intermediários, variando entre 590-850 μm , e com poros menores, variando entre 470-590 μm . Esses últimos em razão de que poros desse tamanho parecem favorecer a formação óssea (GAUTHIER et al., 1998). Para evitar a interferência de outros fatores, a composição química dada pelo revestimento de CaP e a porosidade (85%) foram mantidos constantes. Além disso, o processo de revestimento de CaP foi o mesmo para todos os arcabouços, o que produz a

mesma topografia na superfície de todos eles, uma importante característica para determinar a adesão e proliferação celular (ANSELME; BIGERELLE, 2005).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os arcabouços de PLGA/CaP permitem a proliferação e diferenciação celular, bem como a invaginação de tecidos e formação óssea, independentemente do tamanho dos poros. No entanto, o tamanho dos poros afeta diferentemente os parâmetros avaliados *in vitro* e *in vivo*.

Osteoblastos cultivados sobre os arcabouços de PLGA/CaP mostraram o mesmo perfil de proliferação e atividade de ALP, enquanto a expressão gênica foi muito diferente entre os grupos. A aparente discrepância observada entre atividade de ALP e expressão gênica pode ser devido à sensibilidade dos métodos utilizados. De fato, usando PCR em tempo real é possível observar diferenças sutis que não podem ser vistas utilizando o método bioquímico de determinação da atividade de ALP (ASSIS et al., 2009). A expressão gênica dos marcadores do fenótipo osteoblástico avaliados neste estudo apresentou correlação positiva com o aumento na variação de tamanho de poros. Arcabouços S3 exibiram maior expressão dos genes RUNX2, ALP, COL, OC, BSP e MSX2 e uma redução não estatisticamente significativa na proliferação celular.

Em conjunto, estes resultados são sugestivos de uma maior diferenciação osteoblástica de células cultivadas sobre os arcabouços S3. Talvez esta variação de tamanho de poros, por assemelhar-se ao osso trabecular, faça com que os arcabouços S3 apresentem uma arquitetura que favorece a diferenciação osteoblástica. Esta observação somada o fato destes arcabouços serem facilmente e eficientemente carregados com osteoblastos e exibirem um comportamento *in vitro* semelhante ao de explantes (BELOTI et al., 2009) os tornam uma boa opção para ser usados em engenharia de tecido ósseo.

Nos experimentos *in vivo*, em alguns cortes histológicos, observou-se a presença de esporádicas células gigantes multinucleadas, mesmo após oito semanas de implantação. Essas

áreas estavam localizadas na região superior do arcabouço em contato com a derme que poderia ser a fonte dessas células gigantes multinucleadas. A implantação dos arcabouços de PLGA/CaP por via subcutânea em ratos resultou em uma resposta semelhante (ALBUQUERQUE et al., 2009), embora o revestimento de CaP tem sido capaz de reduzir drasticamente o número destas células (LICKORISH et al., 2004). Como nós não avaliamos os arcabouços antes da implantação, é possível que o processo de revestimento não tenha sido totalmente eficiente em fornecer a camada necessária para cobertura do PLGA, ou esta camada foi alterada devido à microfraturas e conseqüente exposição do polímero durante o manuseio.

Formação óssea em contato com as superfícies do arcabouço foi observada em todas as variações de tamanhos de poros. Devido à ausência de qualquer sinal de formação de cartilagem, parece que a formação óssea ocorreu por ossificação intramembranosa, como seria esperado pelo uso de arcabouços com tamanhos de poros maiores que 300 μm (HUTMACHER et al., 2007; GAUTHIER et al., 1998). Para todos os arcabouços, houve um aumento na formação óssea ao longo do tempo de implantação. Curiosamente, em duas semanas a quantidade de formação óssea e o número de vasos sanguíneos foram semelhantes em todos os arcabouços. No entanto, arcabouços S1 apresentaram um aumento significativo na formação óssea em 4 e 8 semanas, que se correlaciona com um aumento também significativo no número de vasos sanguíneos, em acordo com a importância da neovascularização pós-implantação espontânea para garantir a reparação óssea (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

A vascularização contribui para a formação óssea de muitas maneiras. Pode, através da circulação, trazer células-tronco e células da linhagem osteoblástica que podem participar da formação óssea (PROCKOP, 1997; EGHBAI-FATOURECHI et al., 2005), e fornecer comunicação celular entre as células endoteliais e pericitos que expressam fatores de

crescimento com conhecidos efeitos sobre os osteoblastos, como os fatores IGF-1, PDGF , bFGF, e TGF-beta (DÍAZ-FLORES et al., 2009; VILLARS et al., 2000). Além disso, pericitos podem ter a capacidade de se diferenciar em osteoblastos (DÍAZ-FLORES et al., 2009). Apesar disso, as estratégias para promover a invaginação de vasos sanguíneos e a formação de uma rede vascular não são um tema comum em engenharia de tecido ósseo. A partir de nossos resultados, parece que a utilização de arcabouços com tamanhos de poros em torno de 500 μm proporcionaria a vascularização necessária com o correspondente aumento na formação óssea.

Neste estudo nós mostramos que o compósito PLGA/CaP é um biomaterial promissor para engenharia óssea. Considerando que o tamanho dos poros em torno de 1000 μm favoreceria a expressão fenotípica de osteoblastos, enquanto poros em torno de 500 μm permitem maior formação óssea, parece que o arcabouço ideal deve apresentar poros em ambos os tamanhos. Todavia, o quanto cada um destes tamanhos de poros dos arcabouços é capaz de otimizar as respostas celulares e a formação óssea continua a ser determinado.

3.5 CONCLUSÕES

- As respostas celulares in vitro são favorecidas quando osteoblastos são cultivados em arcabouços com tamanho de poros em torno de 1000 μm .
- A formação óssea e a vascularização in vivo são favorecidas em arcabouços com tamanho de poros em torno de 500 μm .

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO DOS POROS DO ARCABOUÇO DE PLGA/CAP NO CARREAMENTO DE CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS

4. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIÂMETRO DOS POROS DO ARCABOUÇO DE PLGA/CaP NO CARREAMENTO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

4.1 OBJETIVO

Avaliar o efeito do diâmetro dos poros do arcabouço de PLGA/CaP no carreamento de células osteoblásticas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Confeccção do arcabouço de PLGA/CaP

Os arcabouços de PLGA/CaP foram preparados da mesma forma e com as mesmas variações de tamanhos de poros como descrito na seção 3.2.1 do capítulo 1. Para avaliação do carreamento celular foram utilizados arcabouços com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Foram avaliados arcabouços que apresentaram diâmetros de poros variando entre 470-590 μm (S1), entre 590-850 μm (S2) e entre 850-1200 μm (S3).

4.2.2 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais

Foram obtidas células-tronco mesenquimais da medula óssea de 3 ratos Wistar. A obtenção, cultura primária e diferenciação das células-tronco mesenquimais foram realizadas da mesma forma como descrito na seção 3.2.2.1 do capítulo 1.

Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e a solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 1,3 mg/ml de collagenase do tipo II (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e EDTA a 1 mM (Gibco) foi adicionada para obtenção de suspensão de células. Foi obtido um *pool* de células que foi utilizado para avaliação do carregamento na concentração de 20×10^4 células por amostra.

4.2.3 Carreamento das células

Para o carregamento das células osteoblásticas nos arcabouços, foi empregado o método que alterna centrifugação e ressuspensão das células (YANG et al., 2001; BELOTI et al., 2009). Foram colocados em um tubo de centrífuga de 15 ml, as amostras dos arcabouços e 5 ml de meio de cultura contendo suspensão de células osteoblásticas com 20×10^4 células. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 300g por 1 minuto a fim de que as células adentrassem nos poros do arcabouço. Após a centrifugação, o arcabouço foi retirado da suspensão, permanecendo na parede interior do tubo, e o conteúdo restante foi submetido à delicada agitação por pipetagem para ressuspender as células que não tinham sido aprisionadas dentro da estrutura de poros do arcabouço. O ciclo centrifugação/ressuspensão foi repetido por 6 vezes. Ao final de cada ciclo, uma alíquota de 50 µl do conteúdo restante foi utilizada para a contagem celular em um hemocítômetro (Housser Scientific, EUA) e,

então, calculado o número de células incorporadas ao arcabouço ao final de cada ciclo. A eficiência de carregamento ao final de 6 ciclos foi calculada e expressa como porcentagem do número inicial de células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4 Análise estatística

Os dados referentes ao número de células incorporado aos arcabouços com diferentes tamanhos de poros foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Fischer. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para análise da correlação entre a eficiência de carregamento e a variação no tamanho dos poros dos arcabouços. O nível de significância foi de 5%.

4.3 RESULTADOS

Ao longo dos 6 ciclos de centrifugação/ressuspensão observou-se um aumento no número de células incorporadas aos arcabouços, sendo que aqueles do grupo S3 sempre incorporaram mais células, apesar de somente nos ciclos 2, 4 e 5 ter ocorrido diferença estatisticamente significativa (Figura 13).

Ao final dos 6 ciclos, não houve diferença estatisticamente significativa na eficiência de carregamento relacionada ao tamanho dos poros ($p=0,13$). No entanto, houve uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r=0,72$; $p=0,03$) entre eficiência de carregamento e aumento no tamanho dos poros (Figura 14).

Figura 13 – Número de células osteoblásticas carregadas para arcabouços de PLGA/CAP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros durante 6 de ciclos de centrifugação/ressuspensão. Os dados são expressos como somatória do número de células carregadas /ciclo x10⁴ e apresentados como média ± desvio padrão (N = 3). * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p=0,05$ e $p=0,01$ respectivamente.

Figura 14 – Eficiência de carregamento de células osteoblásticas para arcabouços de PLGA/CaP com 3 diferentes variações de diâmetros de poros ao final de 6 ciclos de centrifugação/ressuspensão. Os dados são expressos como porcentagem do número inicial de células e apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($N = 3$).

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do tamanho dos poros dos arcabouços de PLGA/CaP no carregamento de células osteoblásticas para esses arcabouços utilizando o método de centrifugação/ressuspensão de células. Foi observado que todos os arcabouços foram carregados com células independentemente do tamanho dos poros, mas houve uma correlação positiva entre a eficiência do carregamento e o aumento no tamanho dos poros.

O processo de carregamento de células em arcabouços é um dos principais desafios da engenharia de tecidos, sendo crítico para obtenção de um biomaterial híbrido formado por arcabouço e células (ROSA et al., 2008). Três principais métodos de carregamento foram descritos na literatura: dinâmico, estático e culturas com bioreator de perfusão (BURG et al., 2000). A força centrífuga tem sido utilizada para o carregamento de hepatócitos, células cardíacas, células musculares e, mais recentemente, células osteoblásticas para o interior de arcabouços porosos, apresentando como vantagens menor tempo para o carregamento e necessidade de menor concentração de células em comparação com os métodos tradicionais (YANG et al., 2001; GODBEY et al., 2004; DAR et al., 2002; DVIR-GINZBERG et al., 2003; BELOTI et al., 2009). Neste estudo, o método que utiliza centrifugação para o carregamento de células osteoblásticas em arcabouços macroporosos de PLGA/CaP envolveu 6 ciclos de centrifugação e ressuspensão das células em uma suspensão com meio de cultura e células, colocada em contato com o arcabouço. Esta técnica foi descrita originalmente para o carregamento de hepatócitos em um arcabouço poroso de poli vinil (PVF) (YANG et al., 2001). O número de centrifugação e ressuspensão e da força centrífuga utilizada no presente estudo foram baseadas nos trabalhos de Yang et al. (2001) e de Beloti et al. (2009), que demonstraram o apropriado carregamento celular. Em acordo com esses autores, observamos neste estudo, que o número de células aprisionadas nos arcabouços foi aumentando a partir da

centrifugação inicial até a final. Além disso, esse procedimento não interfere com a viabilidade celular de células osteoblásticas (BELOTI et al., 2009).

Um parâmetro que pode afetar a eficiência do carregamento de células é a concentração de células (YANG et al., 2001). Segundo o trabalho de Beloti et al. (2009), a melhor concentração celular para o carregamento de células osteoblásticas em arcabouços de PLGA/CaP foi de 4×10^4 células/mg de arcabouço. No presente estudo, a concentração de células utilizadas foi de 20×10^4 células para cada arcabouço. Este valor foi obtido a partir da média do peso dos arcabouços que foi de 5mg, sendo assim, a melhor concentração celular para avaliar a eficácia de carregamento em arcabouços com diferentes tamanhos de poros foi de 20×10^4 células.

Outro parâmetro que influencia o carregamento celular é o tamanho dos poros do arcabouço para qual as células serão carregadas (LI et al., 2001). O tamanho de poros de arcabouços que apresentam melhor eficiência no carregamento celular é dependente do tipo celular e dos diferentes arcabouços, e este é um assunto pouco discutido e muito divergente. Kitagawa et al. (2006) avaliaram o carregamento tridimensional de células NIH/3T3 em arcabouços de ácido poli-láctico (PLLA), com 3 diferentes tamanhos de poros, em bioreator de perfusão. Os autores verificaram que os arcabouços com tamanhos de poros de 38.2 ± 9.9 μm carregaram mais células em comparação com os arcabouços com poros de tamanhos 68.9 ± 12.6 μm e 21.6 ± 4.0 μm . Já Ng et al. (2010), ao avaliarem a eficiência de carregamento de células HT-29 em uma matriz fibrosa, utilizando a força centrífuga, verificaram que não houve diferença entre as matrizes com poros de 42 μm e 32 μm .

Diferindo destes estudos, os resultados encontrados neste estudo, que utilizou células osteoblásticas, mostraram que arcabouços com poros maiores apresentaram maior eficiência de carregamento e, apesar de não ser estatisticamente diferente, ao final de seis ciclos observou-se que este arcabouço tende a carrear maior número de células. Considerando que o

sucesso dos enxertos ósseos é, em parte, dependente do número de células osteoblásticas presentes (WILK, 2004), é de se esperar que os arcabouços carregados com um número maior de células sejam os mais adequados aos procedimentos de engenharia de tecidos. Assim sendo, os arcabouços com maior tamanhos de poros parecem ser aqueles mais interessantes a serem utilizados.

4.5 CONCLUSÃO

Os arcabouços com diâmetro de poros variando entre 850 e 1200 μm são mais eficientes para o carregamento de células osteoblásticas e, portanto, os mais adequados aos experimentos de engenharia de tecido ósseo.

Capítulo 3

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO INCORPORADO AOS ARCABOUÇOS DE PLGA/CAP NA FORMAÇÃO ÓSSEA *IN VIVO*

5. CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO INCORPORADO AOS ARCABOUÇOS DE PLGA/CaP NA FORMAÇÃO ÓSSEA *IN VIVO*

5.1 OBJETIVO

Avaliar a influência do soro fetal bovino, utilizado para suplementação de meio de cultura de células, incorporado aos arcabouços de PLGA/CaP na formação óssea *in vivo*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Confeccção do arcabouço de PLGA/CaP

Os arcabouços de PLGA/CaP foram preparados da mesma forma como descrito na seção 3.2.1 do capítulo 1. Para este estudo foram utilizados arcabouços com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura e com tamanhos de poros que variavam de 850-1200 μm .

5.2.2 Grupos experimentais

Foram avaliados 3 grupos experimentais de acordo com os tratamentos aos quais os arcabouços foram submetidos, a saber:

- Arcabouços mantidos em meio de cultura osteogênico contendo: meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM – Gibco Life Technologies, EUA), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/ml de vancomicina (Acros Organics, Bélgica), 0,3 μ g/ml de fungizona (Gibco), 50 μ g/ml de gentamicina (Gibco), 5 μ g/ml de ácido ascórbico (Gibco) e 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, EUA);
- Arcabouços mantidos em meio de cultura osteogênico sem a suplementação com soro fetal bovino;
- Arcabouços mantidos em solução salina tamponada (do inglês PBS) suplementada com 15% de soro fetal bovino.

A fim de mimetizar as condições das culturas de células, os arcabouços foram incubados durante 14 dias a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas das soluções foram realizadas a cada 3 ou 4 dias.

5.2.3 Procedimento cirúrgico

Após a incubação, os arcabouços foram implantados bilateralmente em defeitos ósseos críticos (5 mm de diâmetro) na calvária de 9 animais com 4 semanas de idade e peso variando entre 120 e 150 g.

O procedimento cirúrgico foi realizado da mesma forma como descrito na seção 3.2.3.2 do Capítulo 1.

Ao final de 4 semanas de implantação, os animais foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilasina (Dopaser – Calier) e as calvárias contendo as amostras foram removidas para posterior processamento histológico.

5.2.4 Processamento e análise histológica

O processamento das amostras, os cortes em parafina, a aquisição das imagens histológicas, a análise e a quantificação do tecido ósseo formado foi realizado da mesma forma como descrito na seção 3.2.3.3 do capítulo 1.

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Fischer através do software GMC versão 2002. O nível de significância foi de 5%.

5.3 RESULTADOS

Observou-se nas secções histológicas que, os arcabouços mantidos nas soluções que continham soro fetal bovino (meio osteogênico e PBS) apresentaram um infiltrado inflamatório com linfócitos no tecido conjuntivo (Figura 15), e presença de grande quantidade de células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço implantado (Figura 16). Em contrapartida, os arcabouços mantidos em meio osteogênico sem soro fetal bovino, apresentaram tecido conjuntivo com aspectos normais, sem a presença de células inflamatórias, mas apresentando algumas células gigantes multinucleadas (Figuras 15 e 16).

Figura 15 – Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP mantido por 14 dias em diferentes soluções com ou sem soro fetal bovino. A - PLGA/CaP mantido em meio osteogênico com soro fetal bovino; B - PLGA/CaP mantido em meio osteogênico sem soro fetal bovino; C - PLGA/CaP mantido em PBS com soro fetal bovino. S indica o arcabouço de PLGA/CaP; * indica tecido ósseo formado. Barra = 100 μ m. H.E.

Figura 16 – Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP mantido por 14 dias em diferentes soluções com ou sem soro fetal bovino. A - PLGA/CaP mantido em meio osteogênico com soro fetal bovino; B - PLGA/CaP mantido em meio osteogênico sem soro fetal bovino; C - PLGA/CaP mantido em PBS com soro fetal bovino. **S** indica o arcabouço de PLGA/CaP; ➔ indicam células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço. Barra = 50 μ m. H.E.

Em todos os arcabouços, independentemente de em qual solução eles foram incubados, houve a formação de tecido ósseo e a quantidade de osso formado não foi afetada pelo tratamento (Figura 17).

Figura 17 - Formação óssea nos arcabouços de PLGA/CAP, mantido por 14 dias em diferentes soluções, implantados em defeitos ósseos críticos bilaterais, avaliados em 4 semanas de reparo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (N = 5).

5.4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi mostrado que manter os arcabouços em contato com o soro fetal bovino resultou em aumento da resposta inflamatória e no recrutamento de mais células gigantes multinucleadas. Apesar de não estatisticamente significante, isso resultou em menor formação óssea.

O fato de os arcabouços incubados com PBS suplementado com soro fetal bovino terem apresentado resultado similar àqueles incubados com meio de cultura suplementado com a mesma proporção de soro, comprova que moléculas do soro são incorporadas aos arcabouços e resultam em uma resposta biológica mais desfavorável. Tais resultados estão em acordo com experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (BELOTI et al., 2008b).

Embora amplamente utilizados em protocolos para a expansão e diferenciação das células-tronco mesenquimais, o soro fetal bovino apresenta potenciais riscos que não podem ser negligenciados (MANNELLO; TONTI, 2007). Esse soro pode ser um suplemento indesejável para as células que são expandidas para serem transplantadas, pois as proteínas de soro bovino podem induzir respostas imunes xenogênicas devido à ligação destas proteínas aos arcabouços ou às células em cultura que podem atuar como substratos antigênicos, uma vez transplantados (HEISKANEN et al., 2007; SHAHDADFAR et al., 2005; DIMARAKIS; LEVICAR, 2006). Recentemente, foi demonstrado que uma única preparação de 10^8 células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em condições padrões com soro fetal bovino levaria com ela cerca de 7-30 mg de proteínas do soro fetal bovino (SPEES et al., 2004). Em razão disso, protocolos para cultivo dessas células em meios suplementados com outros tipos de soro ou meios livre de soro tem sido avaliados (TURNOVCOVA et al., 2009; CHASE et al., 2010). No entanto, tais alternativas não são aplicáveis aos experimentos pré-clínicos como os realizados nesse estudo, o que torna necessário avaliar o efeito da realização de culturas em

meios livre de soro fetal bovino nos períodos que antecedem a implantação das células nos animais.

Outra causa que poderia ser apontada, seria o fato de que manter os arcabouços incubados resultaria em alteração do revestimento de Ca e P que eles apresentam. Isso resultaria em exposição do polímero PLGA e, conseqüentemente, em respostas biológicas similares às descritas nesse estudo e por Lickorish et al. (2007). No entanto, esses arcabouços mantêm o revestimento intacto após permanecerem por 14 dias incubados em meio de cultura, à semelhança do que foi realizado nesse estudo (DAVIES, 2008) (informação pessoal)¹.

5.5 CONCLUSÃO

A incubação dos arcabouços de PLGA/CaP na presença de soro fetal bovino aumenta a resposta inflamatória aos arcabouços implantados *in vivo* e diminui a formação óssea.

¹ Davies J.E. Mensagem recebida por adalrosa@forp.usp.br em 2009.

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES APÓS A REMOÇÃO DO SORO FETAL BOVINO DO MEIO DE CULTURA

6. CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES APÓS A REMOÇÃO DO SORO FETAL BOVINO DO MEIO DE CULTURA

6.1 OBJETIVO

Avaliar as respostas celulares, em culturas de osteoblastos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais, após a retirada do soro fetal bovino do meio de cultura por períodos de 14 e 24 horas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Grupos experimentais

Foram estudados 3 grupos experimentais, a saber:

- Células mantidas em meio osteogênico por todo o tempo de cultura;
- Células mantidas em meio osteogênico e, nas 14 horas que antecederam as análises, mantidas em meio osteogênico sem soro fetal bovino;
- Células mantidas em meio osteogênico e, nas 24 horas que antecederam as análises, mantidas em meio osteogênico sem soro fetal bovino.

6.2.2 Obtenção e cultura de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais

A obtenção, cultura primária e diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea foram realizadas da mesma forma como descrito na seção 3.2.2.1 do capítulo 1.

Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e a solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 1,3 mg/ml de collagenase do tipo II (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) foi adicionada para obtenção de suspensão de células. Essas células foram subcultivadas na concentração de 2×10^4 células colocadas em poços de placas de 24 poços. Nos grupos submetidos à privação de soro fetal bovino, o meio de cultura com soro foi substituído por meio de cultura sem soro 14 e 24 horas anterior às análises das respostas celulares, respectivamente a cada grupo. Foram avaliados os seguintes parâmetros das respostas celulares:

6.2.2.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada aos 10 dias de subcultura pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma), da mesma forma como descrito na seção 3.2.2.1.1 do capítulo 1 e expressa como densidade óptica.

6.2.2.2 Conteúdo de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada aos 10 dias de subcultura, seguindo o método de Lowry et al. (1951). O meio de cultura foi removido e poços lavados três vezes com PBS aquecido a 37°C. A seguir, os poços foram preenchidos com 2 ml de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choque térmico, que consistiram na exposição da placa em ambiente a -20°C por 20 minutos, seguida de 15 minutos a 37°C. Isso resulta na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água deionizada. Ao final dos ciclos, 1 ml do lisado celular de cada poço foram transferidos para tubos de ensaio, misturados com 1 ml de solução de Lowry (Sigma) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,5 ml da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau's (Sigma) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (CE3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando-se o comprimento de onda de 680 nm. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística e o conteúdo de proteína total foi expresso em mg.

6.2.2.3 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de ALP foi avaliada aos 10 dias de subcultura por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, usando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), da mesma forma como descrito na seção 3.2.2.1.2 do capítulo 1. A atividade de ALP foi normalizada pelo conteúdo de proteína total e expressa como atividade de ALP.

6.2.2.4 Formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 dias de subcultura através da marcação de depósitos de cálcio utilizado o corante vermelho de alizarina (Sigma). O meio de cultura foi removido e poços lavados com 2 ml de PBS aquecido a 37°C. Após, as células foram fixadas com 2ml de solução de formalina 10% por 24 horas e, após esse período, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (30, 50, 70, 90, 96%), mantendo cada solução em contato com as células por 1 hora. Após a desidratação, o álcool 96% foi removido e as placas mantidas semi-abertas até a secagem total. Uma vez secos, os poços foram preenchidos com uma solução de vermelho de alizarina a 2% pH 4,2 (Sigma), mantida durante 8 minutos. Após esse período, o excesso de corante foi removido pela lavagem abundante do material com água bidestilada e as placas novamente foram mantidas semi-abertas até a secagem.

A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico de acordo com Gregory et al. (2004). Foram adicionados 280 µl de ácido acético a 10% a cada poço previamente corado com vermelho de alizarina, e a placa foi levada ao agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *eppendorf* (1,5 ml), e então aquecidos a 85°C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram levados para centrifuga a 20.000g por 20 minutos, e 100 µl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo. Então 40 µl de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados a cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 µl) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (µQuant, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como densidade óptica.

6.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Fischer através do software GMC versão 2002. O nível de significância foi de 5%.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Avaliação das respostas celulares

6.3.1.1 Proliferação celular

A ausência do soro fetal bovino nas culturas de células quer por 14 ($p=0,01$) ou 24 ($p=0,001$) horas causou redução estatisticamente significativa da proliferação celular avaliada aos 10 dias da subcultura. Não houve diferença na redução da proliferação entre a ausência de soro por 14 ou 24 horas (Figura 18).

Figura 18 – Proliferação celular de osteoblastos cultivados em meio osteogênico com soro fetal bovino, e privados de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas, expressa como densidade óptica, avaliada aos 10 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($N = 5$). Os * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p=0,01$ e $p=0,001$ respectivamente.

6.3.1.2 Conteúdo de proteína total

A ausência de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas não ocasionou alterações estatisticamente significantes na síntese de proteína total (Figura 19).

Figura 19 – Conteúdo de proteína total de osteoblastos cultivados em meio osteogênico com soro fetal bovino, e privados de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas, expresso em miligramas (mg), avaliado aos 10 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 5).

6.3.1.3 Fosfatase alcalina

A atividade de ALP, aos 10 dias de subcultura, foi estatisticamente significante menor nas células privadas de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas ($p= 0,01$ e $p= 0,001$, respectivamente) comparada com as células sem privação de soro. Além disso, a redução foi maior no período de 24 horas sem soro ($p= 0,001$) se comparado à 14 horas sem soro (Figura 20).

Figura 20 – Atividade de ALP de osteoblastos cultivados em meio osteogênico com soro fetal bovino, e privados de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas, avaliada aos 10 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($N = 5$). Os * e ** indicam diferença estatisticamente significante para $p= 0,01$ e $p= 0,01$ respectivamente.

6.3.1.4 Formação de matriz mineralizada

A ausência de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas não alterou a quantidade de matriz mineralizada formada (Figura 21).

Figura 21 – Formação de matriz mineralizada de osteoblastos cultivados em meio osteogênico com soro fetal bovino, e privados de soro fetal bovino por 14 ou 24 horas, expressa como densidade óptica, avaliada aos 17 dias de subcultura. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 5).

6.4 DISCUSSÃO

A utilização do soro fetal bovino no meio de cultura é a forma de suplementação mais comumente utilizada em protocolos de cultura de diversos tipos celulares, principalmente por causa de seus altos níveis de fatores de crescimento estimulantes e os baixos níveis de fatores de crescimento inibitórios (MANNELLO; TONTI, 2007). Assim, a maioria dos protocolos atuais para o cultivo *in vitro* de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea incluem soro fetal bovino como suplemento nutricional (SATIJA et al., 2007). No entanto, soro fetal bovino pode ser um suplemento indesejável para as células que são expandidas para serem transplantadas, pois as proteínas de soro bovino podem induzir respostas imunes xenogênicas (HEISKANEN et al., 2007; SHAHDADFAR et al., 2005; DIMARAKIS; LEVICAR, 2006). Em razão disso, várias outras fontes de suplementação alternativas ao soro fetal bovino estão sendo investigados, tais como: soro alogênico (KOCAOEMER et al., 2007; KUNISAKI et al., 2007), plasma rico em plaquetas com trombina ativada (KOCAOEMER et al., 2007), lisado de plaquetas humanas (LANGE et al., 2007; SCHALLMOSER et al., 2007), e fator de crescimento de fibroblastos bovinos (BATTULA et al., 2007).

Nesse estudo mostramos que, a retirada do soro fetal bovino por 14 e 24 horas de culturas de osteoblastos resultou em redução na proliferação celular e na atividade de fosfatase alcalina, sem afetar o conteúdo de proteína total e a formação de matriz mineralizada. Ou seja, ocorre redução nas atividades celulares sem afetar a matriz extracelular.

Em concordância com esses resultados, estudos demonstraram que o meio de cultura sem soro fetal bovino não foi capaz de promover a proliferação celular de células tronco mesenquimais sem a adição de citocinas ou fatores de crescimento (GRONTHOS; SIMMONS, 1995; KUZNETSOV et al., 1997), possivelmente devido ao fato de que o soro

induz oscilações de cálcio intracelular, que são essenciais para proliferação e diferenciação celular (FOREMAN et al., 2006). Além disso, foi relatado que a ausência de soro, em culturas de células-tronco mesenquimais para transplante em tecido cardíaco, causa hipóxia e apoptose celular (ZHU et al., 2006).

Por outro lado, como o conteúdo de proteína total e a formação de matriz mineralizada estão mais relacionados com a formação de matriz extracelular, é possível que os períodos de privação de soro fetal bovino por 14 e 24 horas, utilizados nesse estudo, não tenham sido suficientes para ocasionar alterações detectáveis nessa matriz. Para outros tipos celulares foi demonstrado que meio livre de soro não altera a formação da matriz extracelular (YANG et al., 2010).

Essa aparente redução nas atividades celulares não deve representar prejuízos permanentes às células que excluiriam a possibilidade de as mesmas serem utilizadas em procedimentos de engenharia ou terapia celular. Células que deixaram de proliferar com a retirada do soro podem voltar ao ciclo celular após a re-suplementação com soro (GOS, et al., 2005) e podem suportar a ausência de soro por até 48 horas, sem alterar significativamente a viabilidade e morfologia celulares (BORALDI et al., 2008).

A partir dos resultados encontrados neste estudo, decidimos que o protocolo mais apropriado para o transplante de células-tronco diferenciadas ou não em células osteoblásticas seria a remoção do soro fetal bovino 24 horas ao carreamento.

6.5 CONCLUSÃO

A retirada do soro fetal bovino do meio de cultura quer por 14 ou 24 horas, reduziu a proliferação celular e a atividade de fosfatase alcalina sem afetar o conteúdo de proteína total e a formação de matriz mineralizada.

Capítulo 5

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTÁGIO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO ÓSSEO

7. CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTÁGIO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO ÓSSEO

7.1 OBJETIVO

Avaliar a influência do estágio de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea, associadas ao arcabouço de PLGA/CaP no reparo ósseo.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Confeccção do arcabouço de PLGA/CaP

Os arcabouços de PLGA/CaP foram preparados da mesma forma como descrito na seção 3.2.1 do capítulo 1. Para este estudo foram utilizados arcabouços com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura e com tamanhos de poros que variavam de 850-1200 μm .

7.2.2 Grupos experimentais

Foram avaliados 4 grupos experimentais, a saber:

- Arcabouços de PLGA/CaP sem células;
- Arcabouços de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais indiferenciadas;
- Arcabouços de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 7 dias;
- Arcabouços de PLGA/CaP com células-tronco diferenciadas em osteoblastos por 14 dias.

7.2.3 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais indiferenciadas e diferenciadas em osteoblastos

A obtenção das células-tronco mesenquimais para preparação do biomaterial híbrido (células combinadas com arcabouços de PLGA/CaP) para implantação foi realizada por aspiração de medula óssea de fêmur dos mesmos ratos que posteriormente receberam os implantes, tratando-se portando, de procedimento autólogo. Para isso, 15 ratos da linhagem Wistar com quatro semanas de idade e peso variando entre 100 e 120 g foram anestesiados com solução de Ketamina (7mg/100g de peso corporal) (Agener União) e Xilazina (0,6 mg/100g de peso corporal) (Calier) administrado por via intraperitoneal. A área operada foi submetida à anti-sepsia com solução de povidina-iodo (Rioquímica). Após incisão da pele e tecido subcutâneo, foi realizado punção na epífise distal do fêmur através de uma agulha de metal reutilizável com mandril 40 x 8 (Becton Dickinson, São Paulo, São Paulo, Brasil) e a medula óssea foi aspirada utilizando seringa de 5 ml contendo 1 ml de α -MEM (Gibco) suplementado com 500 μ g/ml de gentamicina (Gibco) e 3 μ g/ml de fungisone (Gibco) e 0,2

ml de heparina sódica 5000 UI / ml (Bergamo, São Paulo, São Paulo, Brasil) (Figura 22). A pele foi suturada com mononylon 3.0 (Ethicon) e a ferida cirúrgica, lavada com solução de povidina-iodo (Rioquímica). Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinina meglumina (10mg/100g de peso corporal) (Banamine, Schering-Plough) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65mg/100g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65mg/100g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge).

Figura 22 – Aspiração da medula óssea de fêmur de rato Wistar. A - Incisão da pele e tecido subcutâneo na região da epífise distal do fêmur. B - Punção na epífise distal do fêmur através de uma agulha de metal com mandril. C - Adaptação da seringa contendo 1 ml de meio de cultura e 0,2 ml de heparina sódica. D - Aspiração da medula óssea.

O conteúdo da medula óssea aspirado juntamente com o meio contido na seringa foram centrifugados a 400 g por 5 minutos, o sobrenadante da centrifugação foi descartado e o precipitado contendo células foi mantido em cultura primária.

As células em cultura primária foram mantidas indiferenciadas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated) com meio de cultura não osteogênico na seguinte composição: α -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/ml de vancomicina (Acros

Organics, Gell, Bélgica), 0,3 µg/ml de fungizona (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco). As células foram cultivadas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 3 ou 4 dias.

No grupo que utilizou células-tronco mesenquimais indiferenciadas, as células da cultura primária em subconfluência foram cultivadas por mais 24 horas em meio de cultura sem soro fetal bovino. Após este período as células foram destacadas do frasco de cultura através da solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 1,3 mg/ml de collagenase do tipo II (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco), carregadas aos arcabouços e implantadas nos ratos.

Nos grupos que utilizaram células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 7 e 14 dias, as células da cultura primária em subconfluência foram enzimaticamente liberadas dos frascos, subcultivadas e diferenciadas em osteoblastos pelos respectivos períodos em meio osteogênico contendo: α-MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50 µg/ml de vancomicina (Acros Organics), 0,3 µg/ml de fungizona (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco), 5 µg/ml de ácido ascórbico (Gibco), 7 mM de β-glicerofosfato (Sigma) e dexametasona 10⁻⁷ M (Sigma). Para o grupo de osteoblastos diferenciados por 7 dias, no 6º dia de subcultura, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura osteogênico sem soro fetal bovino. Para o grupo de osteoblastos diferenciados por 14 dias, esta troca ocorreu no 13º dia de subcultura. Após os períodos de cultura, os osteoblastos foram enzimaticamente liberados, carregados por centrifugação, como descrito abaixo, ao arcabouço de PLGA/CaP e implantados nos ratos.

7.2.4 Carreamento das células

O carreamento das células foi realizado da mesma forma como descrito na seção 4.2.3 do capítulo 2. Neste estudo, após cada ciclo de centrifugação/ressuspensão, não houve contagem celular e no último ciclo (6º ciclo), não houve ressuspensão das células.

7.2.5 Procedimento cirúrgico

Após o carreamento das células, os arcabouços foram implantados de forma autóloga unilateralmente nos defeitos ósseos críticos (5 mm) da calvária dos ratos.

O procedimento cirúrgico foi realizado da mesma forma como descrito na seção 3.2.3.2 do capítulo 1.

Ao final de 4 semanas de implantação, os animais foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilasina (Dopaser – Calier) e as calvárias contendo as amostras foram removidas para posterior processamento histológico.

7.2.6 Processamento e análise histológica

O processamento das amostras, os cortes em parafina, a aquisição das imagens histológicas, a análise e a quantificação do tecido ósseo formado e número de vasos sanguíneos foi realizado da mesma forma como descrito na seção 3.2.3.3 do capítulo 1.

7.2.7 Análise estatística

Os dados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Fischer através do software GMC versão 2002. O nível de significância foi de 5%.

7.3 RESULTADOS

Independentemente da associação com células ou da fase de diferenciação celular, houve formação óssea em todos os arcabouços (Figura 23). Em todos os grupos, foi observado tecido ósseo em íntimo contato com as paredes do arcabouço, caracterizado pela presença de lacunas de osteócitos e revestido por osteoblastos ativos em contato com o tecido ósseo mineralizado. Em algumas áreas, uma linha de cimentação foi observada entre as paredes dos arcabouços e o tecido ósseo (Figura 24). Em outras, observou-se a presença esporádica de células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço. Neste período de 4 semanas não foi possível a observação de osso lamelar.

Figura 23 - Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP associado ou não com células. A – Arcabouço de PLGA/CaP sem células. B- Arcabouço de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais indiferenciadas. C- Arcabouço de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 7 dias. D - Arcabouço de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 14 dias. S indica o arcabouço de PLGA/CaP; * indica tecido ósseo formado. Barra = 100 μ m. H.E.

Figura 24 - Fotomicrografia mostrando defeitos ósseos críticos de calvária de ratos que receberam arcabouço de PLGA/CaP associado ou não com células, evidenciando características comuns entre os grupos. A – Arcabouço de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 14 dias, **S** indica arcabouço de PLGA/CaP, * indica tecido ósseo formado, ➡ indica linha de osteoblastos ativos em contato com o tecido ósseo. B- Arcabouço de PLGA/CaP com células-tronco mesenquimais indiferenciadas, **S** indica arcabouço de PLGA/CaP, * indica tecido ósseo formado, ➡ indica linha de cimentação na superfície do osso em contato com o arcabouço. C - Arcabouço de PLGA/CaP sem células, **S** indica arcabouço de PLGA/CaP, * indica tecido ósseo formado, ➡ indica células gigantes multinucleadas em contato com o arcabouço. Barra = 50 µm. H.E

A análise histomorfométrica mostrou que, após 4 semanas de implantação houve maior formação óssea nos arcabouços associados com células-tronco mesenquimais indiferenciadas ($p=0,05$) e nos arcabouços associados com células-tronco diferenciadas em osteoblastos por 7 dias ($p=0,001$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. No arcabouço associado com células diferenciadas por 14 dias, apesar de um pequeno aumento na formação óssea, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação com o arcabouço sem células. (Figura 25).

O número de vasos sanguíneos, independentemente do período de diferenciação osteoblástica das células transplantadas, foi maior nos arcabouços com células que no arcabouço sem células, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os três grupos associados com células (Figura 26).

Figura 25 - Formação óssea nos arcabouços de PLGA/CaP associados ou não com células, implantados em defeitos ósseos críticos bilaterais, avaliados em 4 semanas de reparo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ($N = 5$). O * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p=0,05$ e $p=0,001$, respectivamente.

Figura 26 – Número de vasos sanguíneos nos arcabouços de PLGA/CaP associados ou não com células, implantados em defeitos ósseos críticos bilaterais, avaliados em 4 semanas de reparo. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (N = 5). O * e ** indicam diferença estatisticamente significativa para $p=0,05$ e $p=0,01$, respectivamente.

7.4 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliada a influência do estágio de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea combinadas com arcabouço de PLGA/CaP na formação óssea *in vivo*. Para isto, foram utilizadas células em três estágios de diferenciação: células-tronco mesenquimais indiferenciadas, células diferenciadas em osteoblastos por 7 dias e células diferenciadas em osteoblastos por 14 dias. Os resultados obtidos mostraram que houve formação óssea em maior quantidade quando os arcabouços foram combinados com células em comparação ao arcabouço sozinho. Em especial, diferenças estatisticamente significantes foram observadas com a combinação de arcabouço com as células indiferenciadas e células osteoblásticas diferenciadas por 7 dias. À semelhança do que foi descrito para os arcabouços sem o uso de células, a maior formação apresentou correspondência com o aumento no número de vasos sanguíneos.

Uma vez que Livingston et al. (2003) demonstraram que células da medula óssea adicionadas ao arcabouço de fosfato de cálcio bifásico não apresentam qualquer potencial osteogênico, nossa estratégia foi cultivar essas células em condições que permitem a adesão das mesmas aos frascos de cultura, que é essencial para a seleção de células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006). Deve-se ainda considerar que, a porcentagem de células-tronco mesenquimais em aspirados de medula óssea é relativamente baixa, variando entre 0,01 a 0,001% do total de células (UNDALE et al., 2009). Portanto, as mesmas devem ser expandidas em culturas para em seguida ser cultivadas em meio que induz a diferenciação osteoblástica (ROSA; BELOTI, 2003a; ROSA; BELOTI, 2003b; BELOTI; ROSA, 2005) antes da sua utilização em procedimentos regenerativos.

Bruder et al. (1998) já haviam relatado o uso de células-tronco mesenquimais na reparação de defeitos ósseos. Tais achados são confirmados pelos nossos resultados. No

entanto, aqueles pesquisadores utilizaram células humanas para regeneração óssea em ratos, diferentemente desse estudo onde as células foram utilizadas de forma autóloga. Essas células têm sido utilizadas em várias situações para o tratamento de diversas condições patológicas, mas parece que sua principal contribuição seria pela secreção de fatores que podem alterar o microambiente favorecendo a reparação tecidual (PHINNEY; PROCKOP, 2007).

Os resultados de outros pesquisadores, embora utilizando métodos de cultura de células e arcabouços diferentes daqueles descritos nesse estudo, corroboram o fato de que células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por períodos curtos favorecem a formação óssea (SIKAVITSAS et al., 2003; CASTANO-IZQUIERDO et al., 2007). Um fator importante seria a presença de células ainda em fase de diferenciação (células pré-osteoblásticas), e não as células que tenham atingido a maturação completa (CASTANO-IZQUIERDO et al., 2007). Isso coincidiria com o período de cultura de 7 dias, quando as células-tronco mesenquimais começam a diferenciar-se e têm o compromisso de tornar-se osteoblastos (LIAN; STEIN, 1992).

Ao menos em parte, a menor formação óssea observada com o uso de células diferenciadas por 14 dias pode ter sido devido ao fato de que nesse estágio muitas das células comprometidas com a diferenciação osteoblástica estavam aprisionadas na matriz extracelular. Assim sendo, o método de liberação enzimática utilizado resultaria em uma população celular não mais indiferenciada e não comprometida com a diferenciação osteoblástica. Em favor dessa hipótese, tem sido demonstrado que passagens sucessivas dessas resultam em perda da expressão do fenótipo osteoblástico (COELHO et al., 2000).

Com base nos resultados encontrados e nas evidências de que as células-tronco mesenquimais contribuiriam com a secreção de fatores, enquanto as células osteoblásticas menos diferenciadas favorecem a reparação óssea, é possível especular que a estratégia ideal para a engenharia de tecido ósseo seria a combinação de ambos os tipos celulares.

7.5 CONCLUSÃO

As células-tronco mesenquimais indiferenciadas e as células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos por 7 dias, associadas ao arcabouço de PLGA/CaP, possibilitaram maior formação óssea e maior número de vasos.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, G.C.; SICCHIERI, L.G.; ROSA, A.L. Avaliação in vivo da biocompatibilidade do arcabouço PLGA/CaP com diferentes diâmetros de poros em diferentes sítios. In: **XVI Congresso Latino Americano de Cirurgia Oral e Maxilofacial**, Foz do Iguaçu, Agosto de 2009.

ANSELME, K.; BIGERELLE, M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. **Acta Biomater.**, v 1, n. 2, p. 211-22, 2005.

ANSELME, K.; NOEL, B.; FLAUTRE, B.; BLARY, M.C; DELECOURT, C.; DESCAMPS, M.; HARDOUIN, P. Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. **Bone.**, v. 25, p. 51S-54S, 1999. Supplement 2.

ASHTON, B.A.; ALLEN, T.D.; HOWLETT, C.R.; EAGLESOM, C.C.; HATTORI, A.; OWEN, M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. **Clin Orthop Relat Res.**, v.151, p. 294-307, Sep. 1980.

ASSIS, A.F.; BELOTI, M.M.; CRIPPA, G.E.; DE OLIVEIRA, P.T.; MORRA, M.; ROSA, A.L. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. **Clin Oral Impl Res.**, v. 20, p 240-46, 2009.

BAKSH, D.; DAVIES, J.E.; KIM, S. Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 9, n. 12, p. 743-8, Dec. 1998.

BATTULA, V.L.; BAREISS, P.M.; TREML, S.; CONRAD, S.; ALBERT, I.; HOJAK, S.; ABELE, H.; SCHEWE, B.; JUST, L.; SKUTELLA, T.; BUHRING, H.J. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. **Differentiation.**, v. 75, p. 279-291, 2007.

BECK JR., G.R. Inorganic Phosphate as a Signaling Molecule in Osteoblast Differentiation. **J Cell Biochem.**, v. 90, n. 2, p. 234-43, Oct. 2003.

BELOTI, M.M.; BELLESINI, L.S.; ROSA, A.L. The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. **Biomaterials.**, v. 26, n. 20, p. 4245-8, Jul. 2005.

BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; DE CARVALHO, P.S.P.; ROSA, A.L. Seeding osteoblastic cells into a macroporous biodegradable CaP/PLGA scaffold by a centrifugal force. **J Biomater Appl.**, v. 23, n. 6, p. 481-95, May. 2009.

BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; DE CARVALHO, P.S.P.; ROSA, A.L. Tissue engineered bone construct from osteoblastic cells and CaP/PLGA scaffold. In: V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto. **COLAOB**, 2008b, p.125-126.

BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; TAGLIANI, M.M.; ROSA, A.L. Bone cell responses to the composite of Ricinus communis polyurethane and alkaline phosphatase. **J Biomed Mater Res A.**, v. 84, n. 2, p. 435-41, Feb. 2008a.

BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Braz Dent J.**, v. 16, n. 2, p. 156-61, 2005.

BERESFORD, J.N. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 240, p. 270-80, Mar. 1989.

BORALDI, F.; ANNOVI, G.; PAOLINELLI-DEVINCENZI, C.; TIOZZO, R.; QUAGLINO, D. The effect of serum withdrawal on the protein profile of quiescent human dermal fibroblasts in primary cell culture. **Proteomics.**, v. 8, n. 1, p. 66-82, Jan. 2008.

BOYAN, B.D.; HUMMERT, T.W.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials.**, v. 17, n. 2, p. 137-46, Jan. 1996a.

BOYAN, B.D.; SYLVIA, V.L.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Cell biology of calcified tissues: experimental models of differentiation and mechanisms by which local and systemic factors exert their effects. **Connect Tissue Res.**, v. 35, n. 1-4, 1996b.

BRUDER, S.P.; KURTH, A.A.; SHEA, M.; HAYES, W.C.; JAISWAL, N.; KADIYALA, S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v. 16, n. 2, p. 155-62, Mar. 1998.

BURG, K.J.; HOLDER JR, W.D.; CULBERSON, C.R.; BEILER, R.J.; GREENE, K.G.; LOEBSACK, A.B.; ROLAND, W.D.; EISELT, P.; MOONEY, D.J.; HALBERSTADT, C.R. Comparative Study of Seeding Methods for Three-dimensional Polymeric Scaffolds, **J Biomed Mater Res.**, v. 51, p. 642-649, 2000.

CASTANO-IZQUIERDO, H.; ALVAREZ-BARRETO, J.; VAN DEN DOLDER, J.; JANSEN, J.A.; MIKOS, A.G.; SIKAVITSAS, V.I. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. **J Biomed Mater Res A.**, v. 82, n. 1, p. 129-38, Jul. 2007.

CHASE, L.G.; LAKSHMIPATHY, U.; SOLCHAGA, L.A.; RAO, M.; VEMURI, M.C. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy.**, v. 1, n. 8, 2010. In press.

COELHO, M.J.; CABRAL, A.T.; FERNANDE, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. **Biomaterials.**, v. 21, n. 11, p. 1087-94, Jun. 2000.

DAR, A.; SHACHAR, M.; LEOR, J.; COHEN, S. Optimization of Cardiac Cell Seeding and Distribution in 3D Porous Alginate Scaffolds. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 80, p. 305-312, 2002.

DE BRUIJN, J.D.; VAN DEN BRINK, I.; MENDES, S.; DEKKER, R.; BOVELL, Y.P.; VAN BLITTERSWIJK, C.A. Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow cells. **Adv Dent Res.**, v. 13, p. 74-81, 1999.

DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; MADRID, J.F.; VARELA, H.; VALLADARES, F.; ACOSTA, E.; MARTÍN-VASALLO, P.; DÍAZ-FLORES JR., L. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. **Histol Histopathol.**, v. 24, n. 7, p. 909-69, 2009.

DIMARAKIS, I.; LEVICAR, N. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. **Stem Cells.**, v. 24, p. 1407-1408, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.**, v. 8, n. 4, p. 315-17, 2006.

DVIR-GINZBERG, M.; GAMLIELI-BONSHTEIN, I.; AGBARIA, R.; COHEN, S. Liver Tissue Engineering within Alginate Scaffolds: Effects of Cell-seeding Density on Hepatocyte Viability, Morphology, and Function. **Tissue Eng.**, v. 9, p. 757-66, 2003.

EGHBAIL-FATOURECHI, G.Z.; LAMSAM, J.; FRASER, D.; NAGEL, D.; RIGGS, B.L.; KHOSLA, S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. **N Engl J Med.**, v. 352, n. 19, p. 1959-66, 2005.

FOREMAN, M.A.; SMITH, J.; PUBLICOVER, S.J. Characterisation of serum-induced intracellular Ca^{2+} oscillations in primary bone marrow stromal cells. **J Cell Physiol.**, v. 206, p. 664-71, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Haematol Blood Transfus.**, v. 25, p. 19-29, 1980.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation.**, v. 6, n. 2, p. 230-47, Mar. 1968.

GAUTHIER, O.; BOULER, J.M.; AGUADO, E.; PILET, P.; DACULSI, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials.**, v. 19, n. 1-3, p. 133-9, 1998.

GODBEY, W.T.; HINDY, S.B.; SHERMAN, M.E.; ATALA, A. A Novel Use of Centrifugal Force for Cell Seeding into Porous Scaffolds. **Biomaterials.**, v. 25, p. 2799-805, 2004.

GOS, M.; MILOSZEWSKA, J.; SWOBODA, P.; TREMBACZ, H.; SKIERSKI, J.; JANIK, P. Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. **Cell Prolif.**, v.38, n. 2, p. 107-16, Apr. 2005.

GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 262, p. 298-311, 1991.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem.**, v. 329, n. 1, p. 77-84, Jun. 2004.

GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science.**, v. 295, p. 1009-1014, 2002.

GRONTHOS, S.; SIMMONS, P.J. The growth factor requirements of STRO-1- positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. **Blood.**, v. 85, p. 929-40, 1995.

GUAN, L.; DAVIES, J.E. Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold. **J Biomed Mater Res A.**, v. 71, p. 480-87, 2004.

HANDSCHEL, J.; WIESMANN, H.P.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N.R.; MEYER, U. Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 21, n. 6, p. 890-8, Nov-Dec. 2006.

HARLEY, B.A.; KIM, H.D.; ZAMAN, M.H.; YANNAS, I.V.; LAUFFENBURGER, D.A.; GIBSON, L.J. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. **Biophys J.**, v. 95, n. 8, p. 4013-24, 2008.

HEISKANEN, A.; SATOMAA, T.; TIITINEN, S. N-Glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. **Stem Cells.**, v. 25, p. 197-202, 2007.

HOLY, C.E.; FIALKOV, J.A.; DAVIES, J.E.; SHOICHET, M.S. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. **J Biomed Mater Res A.**, v. 65, p. 447-53, 2003.

HUTMACHER, D.W.; SCHANTZ, J.T.; LAM, C.X.; TAN, K.C.; LIM, T.C. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **J Tissue Eng Regen Med.**, v. 1, n. 4, p. 245-60, 2007.

IKENOUE, T.; JINGUSHI, S.; URABE, K.; OKAZAKI, K.; IWAMOTO, Y. Inhibitory effects of activin-A on osteoblast differentiation during cultures of fetal rat calvarial cells. **J Cell Biochem.**, v. 75, n. 2, p. 206-14, Nov. 1999.

ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE-KRUGER, G.M.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. **Biomaterials.**, v. 19, p. 1405-412, 1998.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials.**, v. 26, n. 27, p. 5474-91, 2005.

KASTEN, P.; BEYEN, I.; NIEMEYER, P.; LUGINBÜHL, R.; BOHNER, M.; RICHTER, W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. **Acta Biomater.**, v.4, n. 6, p. 1904-15, 2008.

KAUSHAL, S.; AMIEL, G.E.; GULESERIAN, K.J.; SHAPIRA, O.M.; PERRY, T.; SUTHERLAND, F.W.; RABKIN, E.; MORAN, A.M.; SCHOEN, F.J.; ATALA, A.; SOKER, S.; BISCHOFF, J.; MAYER JR., J.E. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. **Nat Med.**, v. 7, p. 1035-40, 2001.

KIM, K.; YEATTS, A.; DEAN, D.; FISHER, J.P. Stereolithographic Bone Scaffold Design Parameters: Osteogenic Differentiation and Signal Expression. **Tissue Eng.**, v. 26, Jun. 2010. In press.

KITAGAWA, T.; YAMAOKA, T.; IWASE, R.; MURAKAMI, A. Three-Dimensional Cell Seeding and Growth in Radial-Flow Perfusion Bioreactor for In Vitro Tissue Reconstruction. **Biotechnol Bioeng.**, v. 93, n. 5, Apr. 2006.

KOCHAEV, A.; KERN, S.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Stem Cells.**, v. 25; p. 1270-78, 2007.

KREBSBACH, P.H.; MANKANI, M.H.; SATOMURA, K.; KUZNETSOV, S.A.; ROBEY, P.G. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. **Transplantation.**, v. 66, p. 1272-78, 1998.

KUBOKI, Y.; JIN, Q.; TAKITA, H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 83, p. S105-15, 2001. Supplement 1.

KUNISAKI, S.M.; ARMANT, M.; KAO, G.S.; STEVENSON, K.; KIM, H.; FAUZA, D.O. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. **J Pediatr Surg.**, v. 42, p. 974-79, 2007.

KUZNETSOV, S.A.; FRIEDENSTEIN, A.J.; ROBEY, P.G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. **Br J Haematol.**, v. 97, p. 561-570, 1997.

LANGE, C.; CAKIROGLU, F.; SPIESS, A.N.; CAPPALLO-OBERMANN, H.; DIERLAMM, J.; ZANDER, A.R. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. **J Cell Physiol.**, v. 213, p. 18-26, 2007.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science.**, v. 260, p. 920-26, 1993.

LANOTTE, M.; SCOTT, D.; DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D. Clonal preadipocyte cell lines with different phenotypes derived from murine marrow stroma: factors influencing growth and adipogenesis in vitro. **J Cell Physiol.**, v. 111, p. 177-186, 1982.

LEBOY, P.S.; BERESFORD, J.N.; DEVLIN, C.; OWEN, M.E. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. **J Cell Physiol.**, v. 146, p. 370-78, 1991.

LEE, S.J.; LEE, I.W.; LEE, Y.M.; LEE, H.B.; KHANG, G. Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for tissue-engineered bone. **J Biomater Sci Polym Ed.**, v. 15, n. 8, p. 1003-17, 2004.

LI, Y.; YANG, S.T. Effects of three-dimensional scaffolds on cell organization and tissue development. **Biotechnol Bioprocess Eng.**, v. 6, p. 311-25, 2001.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 3, p. 269-305, 1992.

LICKORISH, D.; CHAN, J.; SONG, J.; DAVIES, J.E. An in vivo model to interrogate the transition from acute to chronic inflammation. **Eur J Cells Mat.**, v. 13, p. 12-20, 2004.

LICKORISH, D.; GUAN, L.; DAVIES, J.E. A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. **Biomaterials.**, v. 28, n. 8, p. 1495-502, Mar. 2007.

LIVINGSTON, T.L.; GORDON, S.; ARCHAMBAULT, M.; KADIYALA, S.; MCINTOSH, K.; SMITH, A.; PETER S.J. Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 14, p. 211-218, 2003.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: challenges and obstacles. **J Cell Mol Med.**, v. 9, p. 72-84, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov. 1951.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res.**, v. 254, p. 317-30, 1988.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum or nonconditioned medium or ad-hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem cells.**, v. 25, p. 1603-609, 2007.

MAO, X.; CHU, C.L.; MAO, Z.; WANG, J.J. The development and identification of constructing tissue engineered bone by seeding osteoblasts from differentiated rat marrow stromal stem cells onto three-dimensional porous nano-hydroxylapatite bone matrix in vitro. **Tissue Cell.**, v. 37, p. 349-357, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

NEHRER, S.; BREINAN, H.A.; RAMAPPA, A.; YOUNG, G.; SHORTKROFF, S.; LOUIE, L.K.; SLEDGE, C.B.; YANNAS, I.V.; SPECTOR, M. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. **Biomaterials.**, v. 18, n. 11, p. 769-76, Jun. 1997.

NG, R.; GURM, J. S.; YANG, S.T. Centrifugal Seeding of Mammalian Cells in Nonwoven Fibrous Matrices. **Biotechnol Prog.**, v. 26, n. 1, p. 239-45, 2010.

OHGUSHI, H.; OKUMURA, M.; TAMAI, S.; SHORS, E.C.; CAPLAN, A.I. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. **J Biomed Mater Res.**, v. 24, p. 1563-70, 1990.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells.**, v. 25, n. 11, p. 2896-902, Nov. 2007.

PILLIAR, R.M.; LEE, J.M.; MANIATOPOULOS, C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 208, p. 108-13, Jul. 1986.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.**, v. 276, p. 71-4, 1997.

ROOSA, S.M.; KEMPPAINEN, J.M.; MOFFITT, E.N.; KREBSBACH, P.H.; HOLLISTER, S.J. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. **J Biomed Mater Res.**, v. 92, n. 1, p. 359-68, 2010.

ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **Braz Dent J.**, v. 14, n. 1, p. 16-21, 2003b.

ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, n. 1, p. 43-8, Feb. 2003a.

ROSA, A.L.; DE OLIVEIRA, P.T.; BELOTI, M.M. Macroporous scaffold associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. **Expert Rev Med Devices.**, v. 5, p. 719-28, 2008.

SABOLINSKI, M.L.; ALVAREZ, O.; AULETTA, M.; MULDER, G.; PARENTEAU, N.L. Cultured skin as a smart material for healing wounds: experience in venous ulcers. **Biomaterials.**, v. 17, p. 311-20, 1996.

SATIJA, N.K.; GURUDUTTA, G.U.; SHARM, S.; AFRIN, F.; GUPTA, P.; VERMA, Y.K.; SINGH, V.K.; TRIPATHI, R.P. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. **Stem Cell Dev.**, v. 16, p. 7-23, 2007.

SCHALLMOSER, K.; BARTMANN, C.; ROHDE, E.; REINISCH, A.; KASHOFER, K.; STADELMEYER, E.; DREXLER, C.; LANZER, G.; LINKESCH, W.; STRUNK, D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. **Transfusion.**, v. 47, p. 1436-46, 2007.

SCHANTZ, J.T.; HUTMACHER, D.W.; LAM, C.X.; BRINKMANN, M.; WONG, K.M.; LIM, T.C.; CHOU, N.; GULDBERG, R.E.; TEOH, S.H. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. **Tissue Eng.**, v. 9, p. S127-139, 2003. Supplement 1.

SHAHDADFAR, A.; FRONDSDAL, K.; HAUG, T.; REINHOLT, F.P.; BRINCHMANN, J.E. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. **Stem Cells.**, v. 23, p. 1357-66, 2005.

SIKAVITSAS, V.I.; VAN DEN DOLDER, J.; BANCROFT, G.N.; JANSEN, J.A.; MIKOS, A.G. Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. **J Biomed Mater Res A.**, v. 67, n. 3, p. 944-51, Dec. 2003.

SITTINGER, M.; BUJIA, J.; ROTTER, N.; REITZEL, D.; MINUTH, W.W.; BURMESTER, G.R. Tissue engineering and autologous transplant formation: Practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. **Biomaterials.**, v. 17, p. 237-242, 1996.

SPEES, J.L.; GREGORY, C.A.; SINGH, H. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. **Mol Ther.**, v. 9, p. 747-56, 2004.

SROUJI, S.; LIVNE, E. Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. **Mech Ageing Dev.**, v. 126, p. 281-287, 2005.

TENG, Y.D.; LAVIK, E.B.; QU, X.; PARK, K.I.; OUREDNIK, J.; ZURAKOWSKI, D.; LANGER, R.; SNYDER, E.Y. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 99, p. 3024-29, 2002.

TSURUGA, E.; TAKITA, H.; ITOH, H.; WAKISAKA, Y.; KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. **J Biochem.**, v. 121, p. 317-24, 1997.

TURNOVCOVA, K.; RUZICKOVA, K.; VANECEK, V.; SYKOVA, E.; JENDELOVA, P. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. **Cytotherapy.**, v. 11, n. 7, p. 874-85, 2009.

UNDALE, A.H.; WESTENDORF, J.J.; YASZEMSKI, M.J.; KHOSLA, S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic diseases. **Mayo Clin Proc.**, v. 84, p. 893-902, 2009.

VILLARS, F.; BORDENAVE, L.; BAREILLE, R.; AMEDEE, J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? **J Cell Biochem.**, v. 79, p. 672-85, 2000.

WIESMANN, H.P.; JOOS, U.; MEYER, U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 33, n. 6, p. 523-30, Sep. 2004.

WILK, R. Bony reconstruction of the jaws. In: **Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery**. M. Miloro Ed., 2nd Edition, BC Decker, Hamilton, USA, 2004, p. 783-802.

WILLIAMS, J.M.; ADEWUNMI, A.; SCHEK, R.M.; FLANAGAN, C.L.; KREBSBACH, P.H.; FEINBERG, S.E.; HOLLISTER, S.J.; DAS, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials.**, v. 26, n. 23, p. 4817-27, Aug. 2005.

XU, R.H.; CHEN, X.; LI, D.S.; LI, R.; ADDICKS, G.C.; GLENNON, C.; ZWAKA, T.P.; THOMSON, J.A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. **Nat Biotechnol.**, v. 20, n. 12, p. 1261-4, Dec. 2002.

YANG, T.H.; MIYOSHI, H.; OHSHIMA, N. Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold. **J Biomed Mater Res.**, v. 55, p. 379-86, 2001.

YANG, T.L.; HSIAO, Y.C.; LIN, S.J.; LEE, H.W.; LOU, P.J.; KO, J.Y.; YOUNG, T.H. Biomaterial mediated epithelial-mesenchymal interaction of salivary tissue under serum free condition. **Biomaterials.**, v. 31, p. 288-95, 2010.

ZHU, W.; CHEN, J.; CONG, X.; HU, S.; CHEN, X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. **Stem Cells.**, v. 24, n. 2, p. 416-25, Feb. 2006.