



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor**

Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos

Leonardo Rosa da Rocha

Ribeirão Preto  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor**

Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos

Leonardo Rosa da Rocha

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Fogagnolo

Ribeirão Preto  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rocha, Leonardo Rosa da

Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos.  
Ribeirão Preto, 2023.

122 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Orientador: Fogagnolo, Fabrício

1. Células estromais da medula óssea. 2. Aloenxerto. 3. Enxerto ósseo. 4. Regeneração óssea. 5. Bioengenharia de tecidos.

## Folha de aprovação

Rocha, Leonardo Rosa da

Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Ribeirão Preto  
2023

Aos amores da minha vida, Paola, Maricotinha e Bezão.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha esposa Paola, por todo seu amor incondicional, pela paciência, és incansável companheira, sempre ao meu lado na alegria e na tristeza, meu porto seguro, serei eternamente grato por tudo.

Aos meus queridos e amados filhos, Mariana e Bernardo, pelo amor singelo, pelos incentivos, por entenderem e aceitarem minha ausência momentânea do nosso convívio.

Aos meus pais, Tereza e Licínio, pelo amor, pelos valores e princípios, lhes digo que o imenso esforço na minha formação e educação, me permitiu chegar aqui.

Aos meus sogros Cristina e Pepe, pelo amor e por me adotarem como filho.

Aos meus irmãos, Luciana e Leandro, pelo amor e pela eterna amizade.

Ao professor doutor Fabrício Fogagnolo, meu orientador, pela oportunidade, por toda atenção, pelo auxílio, quem admiro e guardarei uma imensa gratidão.

À professora doutora Rhayra Braga Dias, pela amizade, por todos ensinamentos, sem sua ajuda nada disso seria construído, a quem guardarei uma imensa gratidão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e da Universidade de São Paulo e a secretária Rita de Cássia, sem palavras para agradecer.

Aos profissionais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, por toda ajuda.

Aos pacientes, que concordaram em participar, auxiliando esta pesquisa.

À Deus, que permanece iluminando o meu caminho e sempre me agraciando além do que julgo ser merecedor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Assim, os últimos serão os primeiros, e os primeiros serão os últimos, porque muitos são os chamados e poucos os escolhidos.”*  
(Mateus, 20:1 a 16)

## RESUMO

---

ROCHA, LEONARDO ROSA DA. Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos. Ribeirão Preto, 2023. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Perdas de tecido ósseo e distúrbios da consolidação são graves lesões musculoesqueléticas que acometem um crescente número de pacientes nos últimos anos. Quando estas condições são tratadas através de transplantes ósseos, o sucesso na reconstrução óssea depende das propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras do transplante. O padrão-ouro é o autoenxerto, que porém é limitado pela disponibilidade, morbidade e risco de infecção. Na busca de estratégias terapêuticas alternativas para melhorar a regeneração óssea, o uso de aloenxertos vem sendo uma opção, apesar da baixa capacidade de osteoindução e osteogênese. As células estromais da medula óssea, conhecidas pelo potencial osteogênico intrínseco, são alvo de diversos estudos na bioengenharia de tecidos. Considerando que a associação das BMSCs ao aloenxerto poderia reproduzir um material biologicamente semelhante ao enxerto ósseo autólogo, o presente estudo avaliou o potencial regenerativo dos aloenxertos celularizados com BMSCs expandidas *in vitro* através de ensaios de adesão, viabilidade, mineralização *in vitro* e neoformação óssea *in vivo*. Obtivemos um rendimento médio de  $34,25 \pm 10,99 \times 10^6$  células com uma viabilidade média de  $94,77\% \pm 2,34\%$ . Confirmamos a caracterização das BMSCs pela citometria de fluxo e ensaio de diferenciação nas linhagens da natureza mesodérmicas. Os aloenxertos avaliados pela histologia, MEV e quantificação de DNA, apresentaram ótimos resultados na descelularização. Nos ensaios *in vitro* de viabilidade, adesão, proliferação e mineralização, observamos um excelente rendimento do grupo do aloenxerto celularizado com BMSCs, superior ao grupo controle com  $\beta$ -TCP celularizado. Esta superioridade foi confirmada na avaliação do potencial osteogênico *in vivo* e comprovada pela análise histológica e histomorfométrica, com significância estatística. Em conjunto, nossos dados podem elucidar questionamentos e oferecer novas alternativas terapêuticas no contexto da medicina regenerativa e da bioengenharia óssea. Concluímos que o método de coleta, isolamento, caracterização e expansão das BMSCs atenderam aos padrões definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Certificamos que o protocolo de preparo do aloenxerto fornece um material descelularizado, e confirmamos que o aloenxerto é capaz de fornecer suporte estrutural para adesão das BMSCs, oferecendo um microambiente favorável para sobrevivência e diferenciação das células, sendo capaz de induzir a neoformação óssea.

Palavras-chave: Aloenxerto, células estromais da medula óssea, enxerto ósseo, distúrbios da consolidação, regeneração óssea.



## ABSTRACT

---

ROCHA, LEONARDO ROSA DA. Use of bone marrow stromal cells to cellularize allografts. Ribeirão Preto, 2023. Doctoral Thesis. (PhD degree in Health Sciences Applied to the Locomotor System) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2023.

Loss of bone tissue and consolidation disorders are severe musculoskeletal injuries that affect many patients in recent years. When these conditions are treated through bone transplants, success in bone reconstruction depends on the transplant's osteogenic, osteoconductive, and osteoinductive properties. The gold standard is the autograft, which is, however, limited by availability, morbidity, and risk of infection. Despite their low capacity for osteoinduction and osteogenesis, allografts have been used in the search for alternative therapeutic strategies to improve bone regeneration. Bone marrow stromal cells, known for their intrinsic osteogenic potential, are the subject of several studies in tissue bioengineering. Considering the fact that the association of BMSCs to the allograft could reproduce a biologically similar material to the autologous bone graft, the present study evaluated the regenerative potential of allografts cellularized with BMSCs expanded *in vitro* through adhesion, viability, *in vitro* mineralization, and *in vivo* bone neoformation assays. We obtained an average yield of  $34.25 \pm 10.99 \times 10^6$  cells with an average viability of  $94.77\% \pm 2.34\%$ . We confirmed the characterization of BMSCs by flow cytometry and differentiation assay in mesodermal lineages. Allografts evaluated by histology, SEM, and DNA quantification showed excellent results in decellularization. In the *in vitro* viability, adhesion, proliferation, and mineralization assays, we observed an excellent performance in the allograft group cellularized with BMSCs, superior to the control group with cellularized  $\beta$ -TCP. This superiority was confirmed by the evaluation of osteogenic potential *in vivo* and by the histological and histomorphometric analysis, with statistical significance. Together, our data was able to clarify questions and offer new therapeutic alternatives in the context of regenerative medicine and bone bioengineering. We conclude that the collection, isolation, characterization, and expansion method of BMSCs met the standards defined by the International Society of Cellular Therapy. We certify that the allograft preparation protocol provides a decellularized material. We confirm that the allograft can provide structural support for the adhesion of BMSCs, offering a favorable microenvironment for cell survival and differentiation and inducing new bone formation. Finally, with findings superior to  $\beta$ -TCP, our results provide essential information and evidence that the association of allograft with BMSCs presents itself as a promising strategy for conducting clinical trials in bone bioengineering.

Keywords: Allograft, bone marrow stromal cells, bone graft, consolidation disorders, bone regeneration.

## LISTA DE FIGURAS.

---

Figura 1: Visão macroscópica e microscópica do tecido ósseo.....	17
Figura 2: Visão microscópica do tecido ósseo .....	19
Figura 3: Esquema ilustrativo da consolidação óssea .....	22
Figura 4: Imagens da coleta do autoenxerto da crista íliaca .....	30
Figura 5: Tipos de aloenxerto .....	33
Figura 6: Apresentações do $\beta$ -TCP .....	35
Figura 7: Amostra de osso esponjoso .....	48
Figura 8: Processo de isolamento e expansão das BMSCs .....	49
Figura 9: Fragmentos cilíndricos de aloenxerto .....	54
Figura 10: Quantificação de DNA nos aloenxertos .....	55
Figura 11: Preparo do $\beta$ -TCP .....	56
Figura 12: Celularização dos aloenxertos e $\beta$ -TCP .....	57
Figura 13: Avaliação <i>in vivo</i> do potencial osteogênico dos enxertos celularizados .....	61
Figura 14: Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides .....	65
Figura 15: Caracterização das BMSCs quanto a expressão de marcadores de superfície celular e quanto a sua capacidade de diferenciação <i>in vitro</i> .....	66
Figura 16: Avaliação da qualidade de descelularização do aloenxerto .....	67
Figura 17: Avaliação da adesão e proliferação das BMSCs no aloenxerto .....	69
Figura 18: Avaliação <i>in vitro</i> do estímulo a diferenciação osteogênica .....	71
Figura 19: Avaliação histológica dos implantes não celularizados .....	72
Figura 20: Quantificação da neoformação óssea por histomorfometria .....	73

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1: Dados da amostra .....</b>	<b>64</b>
---	-----------

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

---

ALO	Aloenxerto
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética óssea)
BMSCs	<i>Bone marrow stromal cells</i> (Células estromais da medula óssea)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFE	<i>Colony forming efficiency</i> (Eficiência de formação de colônias)
CFU-F	<i>Colony-forming unit-fibroblastoid</i> (Unidade formadora de colônias fibroblastóides)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPC	Centro de Processamento Celular
Cy5	<i>Cyanine 5</i> (cianina 5)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (soro fetal bovino)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Departamento de administração de drogas e alimentos dos Estados Unidos da América)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotílcianato de fluoresceína)
H&E	Hematoxilina e Eosina
HMDS	Hexamethyldisilazane (solução alcoólica etanol / hexametildissilano)
IBMX	Isobutil-metilxantina
Ig	Imunoglobulina
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> (Sociedade Internacional de Terapia Celular)
kV	Kilovolt
$\alpha$ -MEM	<i>Alfa-Minimum Essential Medium</i> (meio essencial mínimo-alfa)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaCl	Cloreto de sódio
OD	<i>Optical Density</i> (densidade óptica)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (solução salina tamponada de fosfato)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)

PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i> (complexo proteína piridina clorofila)
PMMA	Polimetilmetacrilato
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIA	<i>Reamer-irrigator-aspirator</i> (sistema de fresagem-irrigação-aspiração)
SSC	<i>Skeletal Stem Cells</i> (células tronco esqueléticas)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
$\beta$ -TCP	<i>Beta-tricalcium phosphate</i> (Beta-Fosfato tricálcico)
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
cm <sup>3</sup>	centímetro cúbico
g	grama
<i>g</i>	força de gravidade
G	<i>Gauge</i> (calibre)
M	molar
mm	milímetro
mg	miligrama
mM	milimolar
mL	mililitro
nm	nanômetro
ng	nanograma
rpm	rotações por minuto
v/v	volume/volume
$\mu$ g	micrograma
$\mu$ m	micrômetro
$\mu$ l	microlitro
%	percentagem
°C	grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Tecido ósseo: função e estrutura.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Formação e regeneração óssea .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Distúrbios da consolidação e defeitos ósseos.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Tratamento dos distúrbios da consolidação e dos defeitos ósseos .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 Enxertos e substitutos ósseos .....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Enxertos ósseos biológicos .....	29
1.5.1.1 Autoenxerto.....	29
1.5.1.2 Aloenxerto .....	31
1.5.2 Substitutos ósseos sintéticos .....	34
<b>1.6 Células estromais da medula óssea (BMSCs) .....</b>	<b>35</b>
<b>1.7 Terapia com células estromais da medula óssea .....</b>	<b>37</b>
<b>1.8 Uso de BMSCs no contexto da bioengenharia ortopédica.....</b>	<b>39</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>	<b>43</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivo principal .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>44</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Seleção dos participantes da pesquisa e composição da amostra .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Coleta das amostras .....</b>	<b>47</b>

<b>4.4</b>	<b>Isolamento e expansão das células estromais da medula óssea.....</b>	<b>47</b>
4.4.1	Isolamento celular .....	47
4.4.2	Expansão <i>in vitro</i> .....	49
<b>4.5</b>	<b>Caracterização das células estromais da medula óssea (BMSCs).....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides.....	50
4.5.2	Perfil de expressão de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo	51
4.5.3	Avaliação do potencial de diferenciação <i>in vitro</i> das BMSCs.....	51
4.5.3.1	Ensaio de diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> .....	52
4.5.3.2	Ensaio de diferenciação adipogênica <i>in vitro</i> .....	52
4.5.3.3	Ensaio de diferenciação condrogênica <i>in vitro</i> .....	53
<b>4.6</b>	<b>Preparo do aloenxerto.....</b>	<b>54</b>
<b>4.7</b>	<b>Quantificação do DNA presente nos aloenxertos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.8</b>	<b>Preparo do <math>\beta</math>-TCP .....</b>	<b>55</b>
<b>4.9</b>	<b>Celularização dos <i>scaffolds</i> com BMSCs.....</b>	<b>56</b>
<b>4.10</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....</b>	<b>57</b>
<b>4.11</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i> de viabilidade e proliferação celular (ensaio CCK-8) .....</b>	<b>58</b>
<b>4.12</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i> da capacidade de diferenciação osteogênica por fosfatase alcalina .....</b>	<b>58</b>
<b>4.13</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i> da capacidade de diferenciação osteogênica por deposição de matriz mineralizada .....</b>	<b>59</b>
<b>4.14</b>	<b>Avaliação <i>in vivo</i> do potencial osteogênico do enxerto celularizado.....</b>	<b>60</b>
<b>4.15</b>	<b>Processamento histológico .....</b>	<b>61</b>
<b>4.16</b>	<b>Análise histomorfométrica do enxerto ósseo .....</b>	<b>62</b>
<b>4.17</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Características dos pacientes, análise de frequência das CFU-Fs e expansão das BMSC .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização das BMSCs .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da qualidade de descelularização do aloenxerto.....</b>	<b>67</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da adesão e proliferação das BMSCs ao aloenxerto.....</b>	<b>68</b>

<b>5.5</b>	<b>Avaliação <i>in vitro</i> do estímulo à diferenciação osteogênica.....</b>	<b>70</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação <i>in vivo</i> do potencial osteogênico do aloenxerto celularizado com BMSCs.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO B - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO C - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INTO.....</b>	<b>101</b>
	<b>ANEXO D - TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR.....</b>	<b>102</b>
	<b>ANEXO E - TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR.....</b>	<b>103</b>
	<b>ANEXO F - MANUSCRITO SUBMETIDO A REVISTA "CELL AND TISSUE BANKING".....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO H - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DO BANCO DE MULTITECIDOS PARA O PROCESSAMENTO DO ALOENXERTO.....</b>	<b>108</b>



# 1 INTRODUÇÃO

---

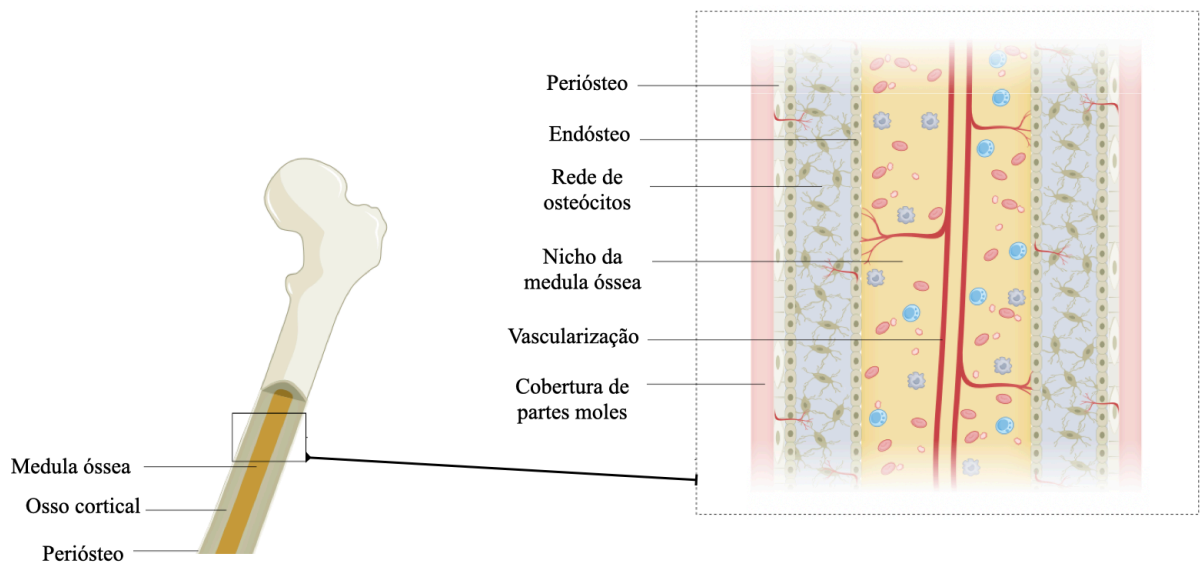
## 1.1 Tecido ósseo: função e estrutura

O tecido ósseo é um sistema complexo, biologicamente ativo e dinâmico, que desempenha diversas funções fisiológicas fundamentais, como a proteção mecânica de órgãos e estruturas vitais, a sustentação corporal, estabilidade e mobilidade dos vertebrados (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; GONG et al., 2015), além de seu importante papel na hematopoese e na homeostase mineral, atuando como reservatório de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (WAUGH; GRANT, 2014; SEOL et al., 2014). Trata-se de um tecido rígido, com elasticidade moderada, baixo peso, altamente vascularizado e dotado de uma rede de fibras nervosas sensitivas e simpáticas (BRAZILL et al., 2019; GONG et al., 2015).

Estruturado hierarquicamente, é composto por duas fases: inorgânica e orgânica. A fase inorgânica ou mineral (65-70%), representada essencialmente por cristais de hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], confere rigidez ao tecido (REZNIKOV; SHAHAR; WEINER, 2014). A fase orgânica do osso (30-35%), composta principalmente por colágeno do tipo I (90%) e ~5% de proteínas não colágenas (como osteocalcina, osteonectina, osteopontina e fosfatase alcalina), é responsável pela manutenção das propriedades elásticas do tecido, pela estabilização da matriz extracelular e pela regulação da mineralização das fibrilas de colágeno (BOSKEY; ROBEY, 2013).

Macroscopicamente, a estrutura óssea é constituída por dois tipos de tecido, o osso esponjoso e o cortical (GONG et al., 2015). O osso cortical representa 80% do esqueleto e consiste em estruturas cilíndricas paralelas e agrupadas (sistemas de Havers), formando a parede externa de todos os ossos. Apresentando uma atividade biológica pouco expressiva, o

osso cortical tem a função mecânica de sustentar tanto as forças de compressão, tensão e torção (OSTERHOFF et al., 2016). Já o osso esponjoso, que corresponde a aproximadamente 20% do esqueleto total, é encontrado próximo às extremidades dos ossos longos, nos corpos vertebrais e no interior dos ossos planos. O osso esponjoso é formado por lâminas, canalículos e trabéculas interconectadas, que mantêm contato direto com a medula óssea (CLARKE, 2008), apresentam a função mecânica de absorver e distribuir forças de compressão e a função biológica de abrigar a medula hematopoiética (OSTERHOFF et al., 2016). Cada segmento ósseo é constituído por proporções diferentes de osso esponjoso e compacto (figura 1), e esta diferença faz com que cada área tenha características biológicas e mecânicas distintas (KINI; NANDEESH, 2012).



**Figura 1: Visão macroscópica e microscópica do tecido ósseo.** A organização dos compartimentos ósseos, compostos de tecido mineralizado e uma rede celular e vascular. (Imagem modificada do artigo de DUDA e colaboradores, 2023).

A função mecânica do osso depende de sua matriz estrutural, enquanto a composição dessa matriz e as atividades das células ósseas determinam seu comportamento biológico (BUZA; EINHORN, 2016). Especificamente nos ossos longos, a constituição do conteúdo mineral é superior a 20%, o que permite que o osso absorva a energia e o mantenha leve para a

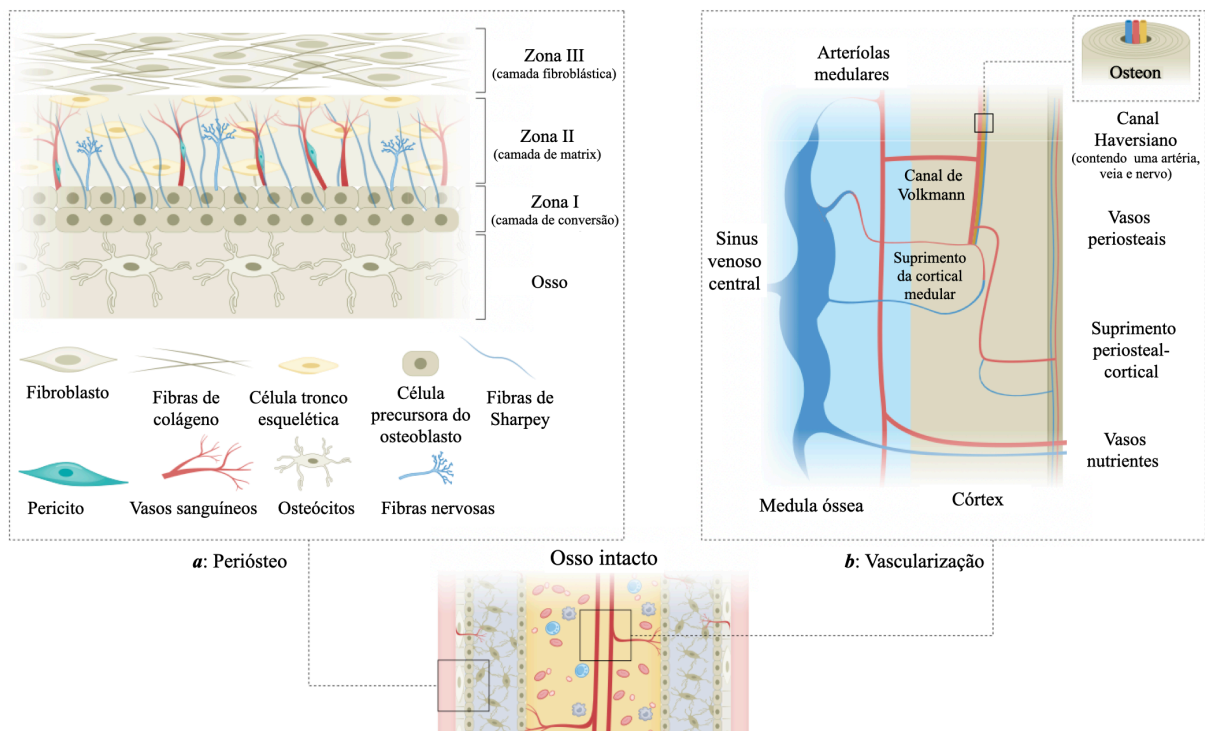
mobilidade (CLARKE, 2008). Assim, quanto maior a quantidade de osso cortical em um segmento ósseo, maior é sua capacidade para resistir à ação de forças deformantes. Entretanto, em virtude da limitada atividade biológica do osso cortical, o processo de regeneração e reparo do osso cortical é mais lento do que no osso esponjoso (LAFAGE-PROUST et al., 2015).

Microscopicamente, os componentes celulares do osso consistem em células precursoras osteogênicas, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células de revestimento ósseo e elementos hematopoiéticos da medula óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Os osteoblastos são derivados de células tronco esqueléticas (*Skeletal Stem Cell* ou SSC), são metabolicamente ativos, responsáveis pela síntese da matriz óssea e subsequente mineralização (AMBROSI et al., 2021; CHAN et al., 2018). Quando os osteoblastos maduros diminuem sua atividade metabólica, tornam-se quiescentes, são envoltos e aprisionados na própria matriz óssea, dando origem aos osteócitos (BONEWALD, 2011).

Os osteócitos são derivados da célula tronco hematopoiética, normalmente encontrados em contato com uma superfície óssea calcificada e são as células mais abundantes do osso, representando de 90 a 95% de todas as células do tecido (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Os osteoclastos reabsorvem o osso por acidificação e proteólise da matriz óssea (EL-JAWHARI; JONES; GIANNOUDIS, 2016). De cada osteócito, uma rede de prolongamentos citoplasmáticos se estende através dos canaliculos cilíndricos até os vasos sanguíneos e outros osteócitos, permitindo a formação de uma rede de comunicação em todo tecido, que em resposta ao microambiente local, é capaz de atuar na remodelação óssea e na atividade de osteoblastos e osteócitos (BOSKEY, 2007; BONEWALD, 2011).

As células de revestimento, derivadas da matriz óssea, formam as camadas de tecido conjuntivo fibroso que recobrem a superfície externa e interna (figura 2), denominadas de

periósteo e endósteo, respectivamente (KAPINAS; DELANY, 2011). Desempenham funções importantes na fixação de tendões e ligamentos, na nutrição da superfície do tecido, no suprimento de células osteoprogenitoras, que auxiliam nos processos de formação e regeneração óssea, e na delimitação do espaço ocupado pela medula óssea (LI et al, 2017; GONG et al., 2015).



**Figura 2: Visão microscópica do tecido ósseo.** (a) O periósteo consiste em três zonas distintas; a zona I, é formada por células precursoras dos osteoblastos; a zona II abriga as células tronco esqueléticas e contém as fibras de Sharpey, que conectam o periósteo ao osso mineralizado; a zona III, a camada mais externa, consiste em fibras de colágeno e fibroblastos. (b) A rede vascular atravessa o osso mineralizado pelos canais de Volkmann e de Havers, que contém arteríolas, vênulas e fibras nervosas. (Imagem modificada do artigo de DUDA e colaboradores, 2023).

## 1.2 Formação e regeneração óssea

Por não se tratar de uma estrutura estática, o tecido é mantido dinamicamente através da formação e a remodelação óssea, que também são empregados no processo de regeneração de fraturas (LIEBERMAN; FRIEDLAENDER, 2005). O processo de formação óssea é o mecanismo pelo qual o osso é formado por osteoblastos (biomineralização) e que ocorre de maneira mais intensa durante o desenvolvimento do esqueleto (ORYAN et al., 2014).

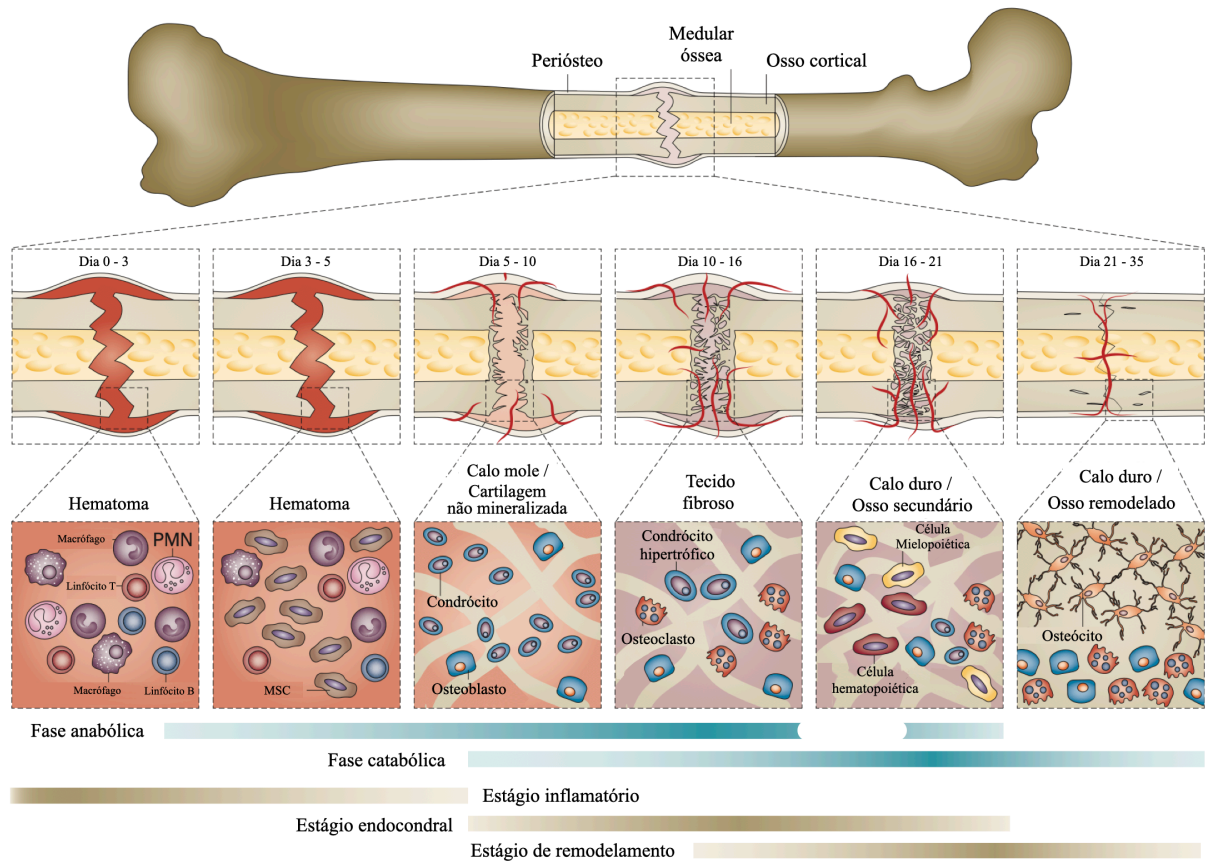
Já a remodelação óssea ocorre ao longo da vida e consiste no processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos, com a digestão das fibras de colágeno e da matriz orgânica, e formação de novo osso no mesmo local pelos osteoblastos. É um mecanismo responsável por manter a função e massa óssea, substituindo, continuamente, o osso velho-danificado por um osso novo (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008). Cerca de 25% do osso esponjoso e 3% do osso cortical são removidos e substituídos anualmente em condições de normalidade (MANOLAGAS; PARFITT, 2010), permitindo a remodelação completa do esqueleto a cada 10 anos (LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016).

A capacidade intrínseca de regeneração do osso é o eixo central do complexo processo de reparo de lesões (MARSELL; EINHORN, 2011). Esse processo é mediado por eventos biológicos e mecânicos, compostos por sequências bem orquestradas de etapas envolvendo diversos tipos celulares e diferentes vias de sinalização molecular e com o objetivo final de promover a regeneração tecidual integral sem a formação de tecido cicatricial fibroso (EHNERT et al., 2021; EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Historicamente, o processo de consolidação óssea foi separado em três fases (fase inflamatória, fase de reparo e fase de remodelação), mas a dinâmica da regeneração óssea é muito mais complexa (GERSTENFELD, 2003). Entretanto, ao final do processo, o osso neoformado recupera as características

fisiológicas e mecânicas, readquiri suas propriedades originais (composição e estrutura) e retoma sua capacidade de se adaptar às forças biomecânicas (BUZA; EINHORN, 2016; FILIPOWSKA et al., 2017).

No cenário clínico, o principal exemplo de regeneração óssea é a consolidação das fraturas, quando as vias utilizadas durante o desenvolvimento embrionário são recapituladas através dos processos de ossificação intramembranosa e endocondral (MARSELL; EINHORN, 2011). Após a ocorrência de um trauma associado a fratura, ocorre sangramento pela lesão dos vasos periosteais, corticais e medulares, iniciando, assim, a mobilização de todos os componentes envolvidos no dano (o osso, o periósteo, a medula óssea e os tecidos moles circunjacentes) para contribuírem com a reparação (BAHNEY et al., 2019). O processo começa com a coagulação do sangue, formação de um hematoma e a ativação da fase pró-inflamatória (SCHMIDT-BLEEK, et al., 2015).

Fases anti-inflamatória e pró-angiogênica subsequentes preparam o microambiente para a indução de uma fase condrogênica, na qual a formação de um calo imaturo, restaura parcialmente a competência mecânica do osso (CLAES; RACKNAGEL; IGNATIUS, 2012). Na sequência, ocorre a hipertrofia dos condrócitos, com a mineralização da matriz e a revascularização, precedendo a formação do tecido, que reestabelece a continuidade óssea (MARSELL; EINHORN, 2011). Com o processo de cicatrização completo, inicia-se a fase de remodelação, que adapta o calo mineralizado ao formato ósseo inicial, reestabelecendo, portanto, a forma e a função do osso de acordo com as competências mecânicas exigidas locais (BUCHER et al., 2019) (figura 3).



**Figura 3: Esquema ilustrativo da consolidação óssea.** Etapas do processo de consolidação secundária com os eventos celulares que caracterizam as fases anabólica e catabólica, o estágio inflamatório, o estágio endocondral e o remodelamento. A escala temporal equivale a uma fratura de fêmur de rato fixada com haste intramedular. (Imagem modificada do artigo de EINHORN e GERSTENFELD, 2015). PMN = leucócito polimorfonuclear; MSC = células mesenquimal estromal.

### 1.3 Distúrbios da consolidação e defeitos ósseos

Aproximadamente 160 a 190 milhões de novas fraturas ósseas ocorrem a cada ano, e mais de 400 milhões de pacientes sofrem de consequências agudas ou de longo prazo destas lesões (WU et al., 2021). De fato, a frequência dessas doenças e distúrbios musculoesqueléticos é maior do que doenças circulatórias, respiratórias e câncer (SHAPIRO, 2021).

Os métodos atuais de gerenciamento das fraturas atingiram um alto padrão tecnológico, garantindo a solidez metodológica da cirurgia e uma alta qualidade no tratamento (WINKLER

et al., 2018). No entanto, em cerca de 2 a 15% das fraturas, podemos observar falhas nos processos biológicos essenciais para cicatrização óssea, cursando com retardo ou ausência da consolidação, necessitando de revisões cirúrgicas (DUMIC-CULE et al., 2015; SCHLICKWEI et al., 2019). Estas complicações aumentam as taxas de mortalidade, afetam a qualidade de vida destes pacientes e representam um custo financeiro considerável para as sociedades e sistemas de saúde (BUZA; EINHORN, 2016; HAK et al., 2014). Os custos anuais com o tratamento das lesões esqueléticas chegam aproximadamente a € 37 bilhões na União Europeia (BORGSTRÖM et al., 2020).

Diversos fatores podem afetar o sucesso da regeneração óssea, como a extensão da perda de tecido ósseo e dos tecidos circundantes, a distância entre os principais fragmentos ósseos, a falta de estabilidade mecânica, alterações no suprimento sanguíneo, fatores individuais do paciente (como idade, comorbidades, tabagismo e deficiências nutricionais), infecções e ressecções oncológicas (KILLINGTON et al., 2018; WALSH et al., 2017; FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015). Nestas condições clínicas complexas, onde a regeneração óssea é necessária em grande quantidade, mesmo após a estabilização cirúrgica ideal, geralmente os pacientes não evoluem para a consolidação (HERTEN et al., 2019).

Claes, Eckert-Hübner e Augat (2003) demonstraram que a extensa perda óssea afeta diretamente a revascularização e a diferenciação tecidual, prejudicando a regeneração óssea. Sendo as diáfises compostas basicamente por tecido ósseo do tipo cortical, a regeneração de perdas extensas neste segmento ósseo é complexa e os defeitos tendem a consolidar lentamente ou até mesmo não consolidar, constituindo um problema de difícil solução (BACKSTEIN; SAFIR; GROSS, 2006). De acordo com a literatura, as fraturas dos ossos longos estão entre as lesões incapacitantes mais comuns em todo mundo (SHAPIRO, 2021). Dos pacientes com fraturas do fêmur, 30% têm retardo da consolidação e 10% evoluem para pseudoartrose



(STEWART, 2019; NICHOLSON, et al., 2021). No entanto, a incidência pode ser muito maior devido à limitação dos métodos de avaliação atuais (ANDRZEJOWSKI; GIANNOUDIS, 2019).

De acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*), uma pseudoartrose é definida como uma fratura de pelo menos 9 meses sem evidências radiográficas de consolidação ou três meses consecutivos sem evolução da consolidação (CALORI et al., 2017). De fato, ainda não há um consenso clínico sobre o que constitui retardo da consolidação e há controvérsia se uma fratura nesta condição deve ser tratada ou se é melhor aguardar a confirmação da pseudoartrose após 6 a 9 meses (NICHOLSON et al., 2021; SIMPSON, 2017).

Avaliação radiológica sequencial continua sendo o padrão clínico para acompanhamento da progressão da consolidação da fratura (CLAES; CUNNINGHAM, 2009). Parâmetros clínicos são sinais adicionais usados para diagnosticar a pseudoartrose (NICHOLSON et al., 2021). No entanto, a avaliação desses critérios é altamente subjetiva e depende da experiência do cirurgião (WITTAUER et al., 2021). A identificação de biomarcadores permitiria o ajuste da estratégia de tratamento (POUNTOS et al., 2013). Pesquisas ativas buscam validar diversos marcadores, como fatores inflamatórios, angiogênicos e de formação óssea (como a fosfatase alcalina) (CHITWOOD et al., 2021). Embora tais marcadores possam ser utilizados para monitorar o processo de consolidação, seu valor prognóstico é limitado e provavelmente nenhum biomarcador único seja capaz de prever o diagnóstico da consolidação (CHITWOOD et al., 2021).

#### **1.4 Tratamento dos distúrbios da consolidação e dos defeitos ósseos**

Em um número relevante de pacientes, a restauração da integridade tecidual não ocorre espontaneamente (POUNTOS et al., 2013) e esses pacientes necessitam, em média, de duas

intervenções cirúrgicas adicionais (ALT et al., 2009), apresentam dor persistente (GELALIS et al., 2012), hospitalização prolongada e tempo médio de reabilitação de 23 meses (ALT et al., 2009).

De fato, durante muitos anos, pacientes com grandes defeitos ósseos foram tratados com amputações primárias (BOSSE et al., 2002). No entanto, atualmente, existem diversos métodos de tratamento disponíveis e que podem ser usados isoladamente ou em combinação (MURPHY et al., 2013). Estão inclusos os recursos da enxertia óssea, osteogênese por distração e, mais recentemente, a engenharia de tecidos baseada em células (GIANNOUDIS; EINHORN, 2009). Nenhuma destas técnicas tem sua eficácia livre de questionamentos, seja pelo longo período de tratamento, pela morbidade associada ou pela regeneração incompleta da lesão (BACKSTEIN; SAFIR; GROSS, 2006). Assim, as propostas de reconstrução voltadas para a obtenção de bons resultados clínicos e manutenção do membro continuam sendo prioritárias para o cirurgião ortopédico (EL-ROSASY, 2007).

Os enxertos ósseos autólogos continuam sendo o “padrão ouro” no tratamento de pequenos defeitos ósseos ou inferiores a 5 cm<sup>3</sup>, com boa cobertura das partes moles (SCHMIDT, 2021). Contudo, para os defeitos com mais de 5 cm<sup>3</sup> esta abordagem não é indicada, porque como o enxerto sofre reabsorção e a vascularização não reproduz os padrões anatômicos locais, resultando em uma zona de fragilidade óssea com alta predisposição para fraturas (MASQUELET, 2003). Defeitos com maiores dimensões, com ou sem lesão de partes moles associadas, são lesões complexas, de difícil abordagem e que necessitam de tratamento especializado. As principais estratégias terapêuticas para os defeitos segmentares são os enxertos ósseos vascularizados (TAYLOR; MILLER; HAM, 1975; LENZE et al., 2017), a distração osteogênica ou transporte ósseo interno com fixador externo (GIOTAKIS;

NARAYAN; NAYAGAM, 2007) e a técnica da membrana induzida descrita por Masquelet (MASQUELET et al., 2000).

O enxerto ósseo vascularizado geralmente é obtido de alguns sítios anatômicos clássicos como crista ilíaca, costela e fíbula, no qual é retirado com o retalho cutâneo e com seu pedículo vascular, que é anastomosado na área receptora (TAYLOR; MILLER; HAM, 1975; LENZE et al., 2017). A fíbula, por ser um osso reto, com cerca de 25 cm, com boa densidade cortical, bom pedículo vascular e que produz uma baixa morbidade no sítio doador, é a melhor opção para reconstrução de defeitos muito extensos, principalmente os localizados na diáfise femoral (WEI et al., 1997; HOUDEK et al., 2017). Alguns estudos comprovam que a utilização do enxerto autólogo vascularizado leva a resultados superiores do que os enxertos não vascularizados, uma vez que a circulação sanguínea do enxerto não é interrompida, fazendo com que o número de células viáveis no local seja maior e a consolidação óssea mais rápida (WEILAND, 1981; YAJIMA; TAMAI, 1994; FINKEMEIER, 2002). As complicações pós-operatórias estão relacionadas, quase sempre, com a anastomose vascular, com a utilização de fixador externo e com a perda de angulação do enxerto (MINAMI et al., 2000; FEUVRIER et al., 2016).

A osteogênese por calotagem ou distração, descrita por Ilizarov em 1986, é uma opção utilizada para tratar os defeitos segmentares dos ossos longos sem comprometimento das partes moles (ARONSON; JOHNSON; HARP, 1989; POLYZOIS et al., 1997; ZAMORA-MUÑOZ; ORELLANA-RETA, 2007). É um processo no qual se induz a formação óssea no foco de uma osteotomia, no segmento de osso saudável, distante da área lesada, através de distração do fragmento ósseo com a utilização de um aparelho de fixação externa, com sistema de alongamento gradual (ILIZAROV; LEDYAEV, 1992). Este fragmento intercalar, entre a osteotomia e o defeito ósseo, é transportado longitudinalmente à medida que o segmento é tracionado. O ajuste do fixador a uma velocidade de 0,25 mm quatro vezes ao dia (total de 1

mm / dia) é feito até atingir o comprimento total do alongamento ósseo, preenchendo, assim, o defeito pré-existente (ARONSON, 1997). Embora esta seja uma técnica eficaz, requer longos períodos de tempo com fixador externo e tem altas taxas de complicações (MASQUELET; BEGUE, 2010; ABDEL-AAL, 2006).

A técnica da membrana induzida ou a técnica de Masquelet foi descrita há mais de 30 anos para o tratamento das perdas ósseas secundárias a infecção (MASQUELET et al., 2000). Na descrição original de Masquelet, a técnica é realizada em dois tempos cirúrgicos e pode ser utilizada em lesões infectadas ou lesões previamente irradiadas (MASQUELET; BEGUE, 2010). No primeiro tempo cirúrgico, a lesão é debridada e preenchida por espaçador de cimento de polimetilmetacrilato (PMMA), em torno do qual é formada a membrana pseudo-sinovial, conhecida como membrana de Masquelet. A primeira função do espaçador é mecânica, impedindo a invasão da área da lesão por tecido fibroso. A segunda é biológica, dada pelo ambiente da membrana que irá fornecer suprimento de sangue para o osso enxertado e impedir a sua reabsorção (MASQUELET et al., 2000; PELISSIER et al., 2002 e 2004; GIANNOUDIS et al., 2011). O segundo tempo cirúrgico é realizado cerca de dois meses depois do primeiro e consiste da retirada do espaçador e preenchimento da câmara delimitada pela membrana por enxerto ósseo (WONG et al., 2014).

Masquelet e colaboradores, em sua recente avaliação da técnica incluindo o seguimento por 10 a 22 anos de 18 pacientes, salientam alguns pontos que podem estar relacionados com o sucesso ou insucesso do tratamento. Um aspecto reforçado pelo autor é que a técnica é indicada apenas para pacientes comprovadamente sem infecção (MASQUELET; KISHI; BENKO, 2019). Outra avaliação feita pelo autor foi o tipo de preenchimento da câmara formada pela membrana. Na descrição clássica, o preenchimento considerado ideal é o enxerto autólogo de osso da crista ilíaca. Contudo, pela limitação dos sítios doadores e considerando que para o

sucesso do tratamento a câmara precisa ser preenchida integralmente com osso esponjoso compactado, na imensa maioria dos pacientes, há necessidade de associar o enxerto autólogo com aloenxerto na proporção de 1:3 (MASQUELET, 2017; MASQUELET et al., 2019).

## **1.5 Enxertos e substitutos ósseos**

Para apoiar a regeneração óssea diante de condições abaixo do ideal, como no retardo da consolidação, na pseudoartrose, no defeito ósseo, na baixa qualidade óssea ou no suprimento sanguíneo insuficiente, a enxertia óssea é um dos métodos cirúrgicos mais utilizados em procedimentos ortopédicos (FILLINGHAM; JACOBS, 2016; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Trata-se do segundo transplante de tecidos mais frequente, logo após a transfusão sanguínea (CAMPANA et al., 2014).

De acordo com Moore, Graves e Bain (2001), para um enxerto ósseo ser considerado ideal, no âmbito da regeneração óssea, ele deve conter três propriedades que se completam, a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução. A capacidade biológica do enxerto é formada pelo somatório destas funções biológicas básicas essenciais.

A osteoindução é a capacidade que o tecido ósseo transplantado tem de induzir o recrutamento de suas células tronco e progenitoras, que se diferenciarão em um fenótipo formador de osso, do tecido hospedeiro (WANG; YEUNG, 2017; FILLINGHAM; JACOBS, 2016; ORYAN et al., 2014). Osteocondução é a capacidade pelo qual um enxerto atua, passivamente, como um suporte estrutural (*scaffold*) para o crescimento ósseo sobre sua superfície, canais ou poros *in vivo* (KHAN et al., 2005). Todos os enxertos que fornecem uma estrutura, fornecem alguma medida de osteocondutividade (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Osteogênese refere-se à capacidade de neoformação óssea por células osteoblásticas presentes no enxerto (ORYAN et al., 2014; ROBERTS; ROSENBAUM, 2012).

### 1.5.1 Enxertos ósseos biológicos

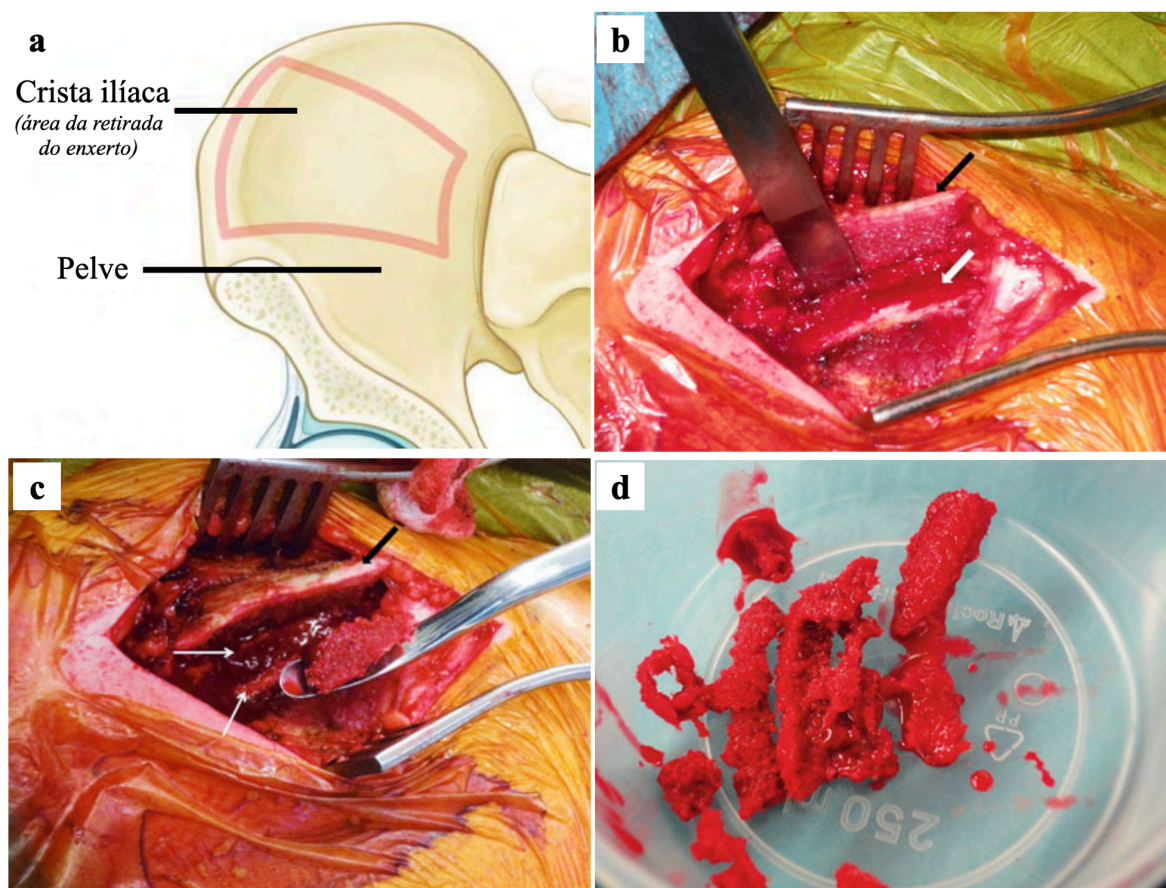
A literatura considera enxertos ósseos biológicos ou naturais: (i) os autoenxertos ou autólogos, que representam um tecido transplantado de um local do esqueleto para outro no mesmo indivíduo, (ii) os aloenxertos, sendo um transplante entre indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes, e por fim, (iii) o xenoenxerto, materiais transplantados entre espécies diferentes (ORYAN et al., 2014; BLOKHUIS; ARTS, 2011).

#### 1.5.1.1 Autoenxerto

Entre todos os enxertos disponíveis, o autoenxerto é considerado biologicamente ideal, por possuir todas as propriedades necessárias na regeneração óssea em termos de osteocondução, osteoindução e osteogênese (SEN; MICLAU, 2007; AYUKAWA et al., 2015). Motivo pelo qual, é considerado o tratamento padrão na enxertia óssea, representando aproximadamente 58% de todos os enxertos realizados (ORYAN et al., 2014).

A crista ilíaca é a fonte mais comum de obtenção do autoenxerto (figura 4), tendo potencial de osteoindução, conferido por fatores solúveis (como proteínas morfogênicas e fatores de crescimento), de osteogênese, por conter um grande número de células viáveis, e de osteocondução, por fornecer o suporte adequado para a neoformação óssea (ZIGDON-GILADI et al., 2015). Além disso, o enxerto autólogo possui histocompatibilidade completa (ausência de reações imunológicas cruzadas) e é desprovido do risco de transmissão de infecções (GARCÍA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015). Entretanto, a sua obtenção a partir da crista ilíaca requer um procedimento cirúrgico adicional que pode resultar em complicações, como dor crônica, infecção, perda sensorial local e instabilidade do sítio doador, que podem estar presentes entre 8,6 % e 30 % dos pacientes (ORYAN et al., 2014; FROHLICH; POTVIN, 2008;

FINKEMEIER, 2002). Além disso, a limitação da quantidade de enxerto que pode ser retirado deste sítio anatômico (AHLMANN et al., 2002; ST JOHN et al., 2003; FRANCE et al., 2015) representa o principal problema. Em média, o volume de osso cortico-esponjoso disponível para coletar na crista ilíaca anterior é de 16 a 26 cm<sup>3</sup> e de 34 cm<sup>3</sup> na crista ilíaca posterior (KILINC et al., 2017).



**Figura 4: Imagens da coleta do autoenxerto da crista ilíaca.** (a) ilustração da pelve destacando a área da crista ilíaca de retirada de enxerto; (b) Imagem após a realização da osteotomia da porção ântero-posterior do ilíaco; (c) Enxerto ósseo esponjoso é retirado entre as lâminas interna e externa do osso ilíaco; (d) Enxerto esponjoso em um frasco de 250 mL (Imagens modificadas dos artigos de Giannoudis, Karadimas e Kanakaris, 2012 e Drinnon e colaboradores, 2020).

Outra fonte de enxerto ósseo autólogo é a fresagem do canal medular pelo método RIA (*Reamer-Irrigator-Aspirator*), que consiste no alargamento do canal medular dos ossos longos acoplado a um sistema de irrigação-aspiração para coletar material da medula óssea e pequenos fragmentos ósseos. O sistema RIA fornece uma grande quantidade de enxerto autólogo,

(volume máximo de 90 cm<sup>3</sup>), (COX et al., 2011), que reproduz as propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução do osso esponjoso obtido da crista ilíaca (KUEHLFLUCK et al., 2015). Contudo, a utilização do sistema requer um alto preparo técnico do cirurgião, visando a prevenção de complicações graves como fratura, perfuração da cortical durante a coleta, grandes perdas sanguíneas, procedimento cirúrgico adicional e custos substanciais (MADISON; NOWOTARSKI, 2019; GIORI; BEAUPRE, 2011; ST JOHN et al., 2003).

#### 1.5.1.2 Aloenxerto

Nas situações em que os autoenxertos não são suficientes ou possíveis, uma fonte alternativa bastante utilizada é o aloenxerto ou enxerto homólogo, representando 34% dos enxertos ósseos (ORYAN et al., 2014). Eles são obtidos por doação *inter-vivo* ou *post-mortem*, disponíveis em bancos de tecidos autorizados, que captam o osso, realizam o processamento (removendo todo conteúdo orgânico) e armazenam os tecidos (BALDWIN et al., 2019; IVORY; THOMAS, 1993; MAKLEY, 1985). O uso do aloenxerto elimina os problemas associados (1) com o procedimento cirúrgico para a retirada do enxerto da crista ilíaca, (2) com a limitação da quantidade que pode ser retirada do sítio doador (ORYAN et al., 2014).

O aloenxerto fornece uma microestrutura para sustentar a vascularização, o crescimento e a remodelação óssea durante o período de incorporação, mantendo o potencial de osteocondução (FALDINI et al., 2011). Além disso, estão disponíveis em várias apresentações (cortical ou esponjoso), formas (cubos, cilindros, cavilhas e grânulos) e tamanhos (BALDWIN et al., 2019). No entanto, quando comparado ao enxerto autólogo, seu potencial de osteoindução e osteogênese é baixo (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011; EINHORN, 2005; HORNICEK et al., 2001). Uma desvantagem dos aloenxertos é a necessidade de realizar processos de esterilização e descélularização para minimizar os riscos de transmissão de



doenças e de reações de imunogenicidade, no entanto, esses procedimentos podem alterar as propriedades biológicas e mecânicas, reduzindo qualquer potencial osteoindutor e osteogênico (SOHN; OH, 2019; CHATTERJEA et al., 2010).

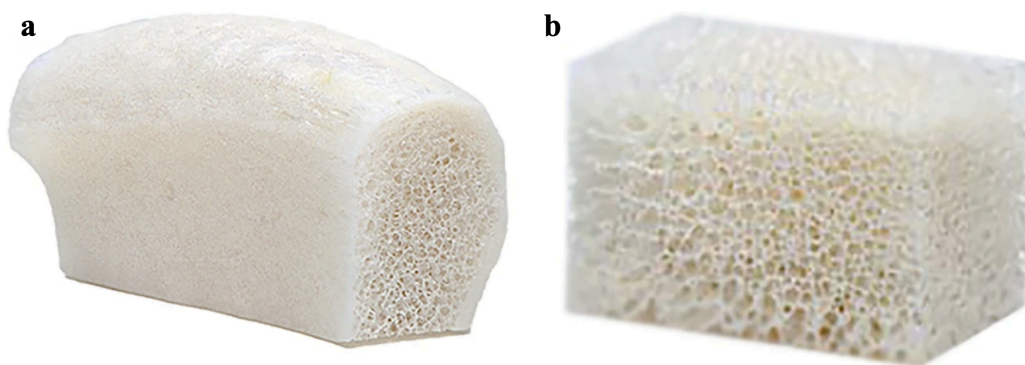
Os métodos de descelularização mais empregados podem ser categorizados em 3 grupos diferentes: métodos físicos (ciclos de congelamento e descongelamento), métodos químicos (ácidos, detergentes e solventes) e métodos enzimáticos (usando proteínas como tripsina e dispase) (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). E, independente de qual seja o método empregado, esses visam principalmente, a redução da antigenicidade do tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Para realizar a descelularização, os bancos de tecidos não se restringem a utilização de apenas um método dentro daquelas 3 categorias listadas e, em sua maioria, os protocolos usam uma série de combinações de métodos diferentes para que se obtenha um produto efetivamente desvitalizado (MENDIBIL et al., 2020).

Todas as diferentes estratégias têm como objetivo exaurir as células no tecido e reduzir a quantidade de material genético residual. Ademais, cada estratégia escolhida deve variar de acordo com o tecido de origem, assim como o tecido ao qual o aloenxerto será destinado (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Contudo, não é possível remover 100% dos componentes celulares, sendo possível detectar moléculas como DNA, fosfolípidos e etc. Embora esses componentes não possam ser totalmente eliminados, é sabido que baixas concentrações deles não são suficientes para estimular uma resposta inflamatória no hospedeiro. Dessa maneira critérios mínimos de aceitação para satisfazer uma descelularização bem-sucedida foram sugeridas por Crapo, Gilbert e Badylak (2011), são eles:

- < 50 ng dsDNA por mg de MEC ou;
- <200 pb fragmentos de DNA e;

- Ausência de material genético visível em sessões de tecido coradas com DAPI ou H&E.

Diversos estudos realizados nas décadas de 80 e 90, quando eram utilizados aloenxertos frescos congelados, sem triagens rigorosas e/ou rígidos processos de esterilização, descellerização e armazenamento, relatavam uma incidência geral de infecções relacionadas a aloenxertos de 0,014% (MCALLISTER et al., 2007). Após uma revisão de todos os transplantes de tecidos nos EUA, de 1982 a 1991, foram identificados 12 casos de transmissão de HIV, a partir de ossos criopreservados frescos, com todos os eventos ocorrendo entre 1984 e 1986 (HINSENKAMP et al., 2012). Outros estudos também relatam reações de imunogenicidade com o aloenxerto (ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011; GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Estudos recentes concluem que este risco de transferência de doenças por aloenxertos processados, provenientes de banco de ossos para o receptor do enxerto, é insignificante (BRINK, 2021).

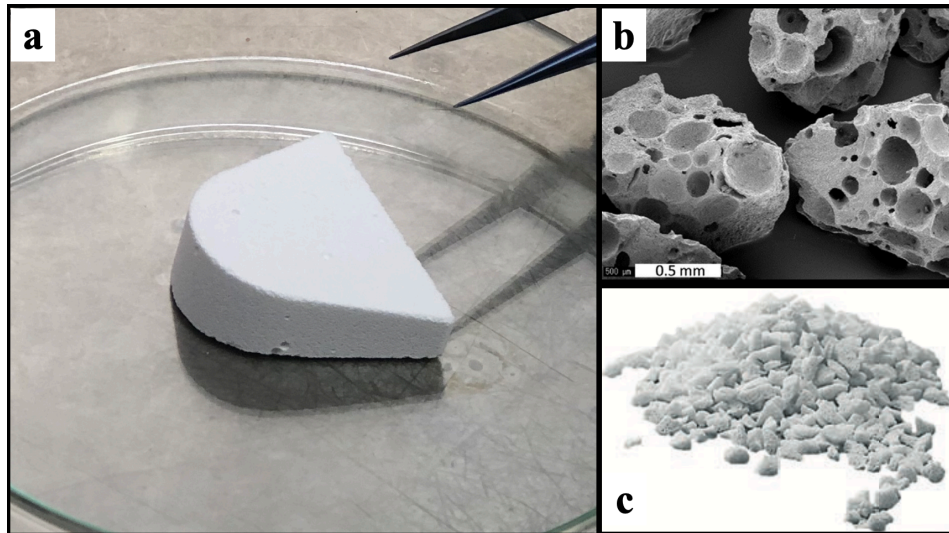


**Figura 5: Tipos de aloenxerto.** Imagem exemplificando dois tipos de aloenxerto. (a) fragmento cortico-esponjoso do íliaco; (b) bloco de osso esponjoso. (Imagens modificadas do artigo de Samsell e colaboradores, 2019).

### 1.5.2 Substitutos ósseos sintéticos

O constante aumento de disfunções esqueléticas, por trauma ou doença, associado a baixa oferta de enxertos ósseos naturais, com uma pequena chance de atender a demanda de um cenário futuro, estimularam o aparecimento dos substitutos ósseos sintéticos. Estes materiais possuem como pré-requisitos: a biocompatibilidade e a inércia imunológica. Além disso, precisam de uma adequada cinética de reabsorção e a forma apresentada para aplicação (sólido, granulado e pasta) deve ser considerada de acordo com a particularidade do caso (MIRON; ZHANG, 2012). Idealmente, deve envolver as três importantes propriedades biológicas dos enxertos ósseos (osteocondução, osteoindução e osteogênese) e produzir a osteointegração, que podemos definir como a capacidade do implante ser ancorado com a formação de tecido ósseo ao seu redor, na interface osso-implante sem a formação de tecido fibroso (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; KHAN et al., 2005). Devem conferir estabilidade mecânica precoce para proteger o defeito de fratura ou colapso e promover vascularização suficiente dentro da construção para regeneração óssea (LASCHKE et al., 2009).

Os materiais sintéticos disponíveis e amplamente utilizados são os biomateriais cerâmicos, principalmente a hidroxiapatita e o beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP), e combinações dos mesmos (ZWINGENBERGER et al., 2012). São materiais inorgânicos, bioativos, caracterizados por baixa condutividade elétrica e térmica, e alta resistência química (KISSLING et al., 2016). Apresentam alta biocompatibilidade e possuem resistência à compressão e corrosão (IAQUINTA et al., 2019). O  $\beta$ -TCP é quimicamente semelhante ao osso, possui uma estrutura porosa, com macroporos interconectados e microporos, que favorece a invasão vascular e a substituição óssea, mas também uma rápida reabsorção (BHATT; ROZENTAL, 2012). O  $\beta$ -TCP é capaz de modular a adesão e proliferação celular, induzindo a neoformação óssea (GINEBRA et al., 2018).



**Figura 6: Apresentações do  $\beta$ -TCP.** (a) bloco de  $\beta$ -TCP, em cunha de  $10^\circ$ , com  $25 \times 35 \times 10$  mm de dimensão; (b) imagem por MEV dos grânulos de  $\beta$ -TCP; (c) visão macroscópica dos grânulos de  $\beta$ -TCP. (Imagens modificadas do artigo de Bohner, Santoni e Döbelin, 2020).

## 1.6 Células estromais da medula óssea (BMSCs)

No complexo microambiente da medula óssea pós-natal, coabitam dois sistemas de células tronco independentes: o sistema hematopoético e o sistema estromal. O sistema hematopoético engloba, predominantemente, as células tronco  $CD34^+$  e uma população de progenitores capazes de se diferenciar em todas as células sanguíneas encontradas no organismo humano (MORRISON; UCHIDA; WEISSMAN, 1995). O sistema estromal é formado durante o desenvolvimento da cavidade medular, quase simultaneamente com a colonização pelas células hematopoiéticas, tendo como seu principal componente as células estromais, que são derivadas do mesoderma, responsáveis pela origem do osso, cartilagem, adipócito, fibroblastos e do estroma de sustentação da medula hematopoiética (BIANCO, 2011; CHARBORD et al., 1996).

As primeiras evidências de que a medula óssea continha uma segunda população de células-tronco, além da hematopoiética, surgiram na década de 1960. Os experimentos de

Friedenstein, Shapiro e Petrakova (1966) e Tavassoli e Crosby (1968), foram fundamentais para demonstrar a existência dessas células e algumas de suas características, como a capacidade de crescimento e proliferação em Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (*Colony Forming Units – Fibroblast* ou CFU-F), seu alto índice proliferativo *in vitro* e a capacidade de estabelecer expansões clonais, independentemente, da densidade de plaqueamento (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; BIANCO et al., 2013).

Nessa linha de pesquisa, os autores demonstraram que a porção estromal da medula óssea, quando transplantadas *in vivo*, induziam a formação de tecido ósseo ectópico. Histologicamente, estes ossículos continham todas as linhagens maduras encontradas em um segmento ósseo, isto é, osteócitos aprisionados em matriz óssea, osteoblastos, adipócitos e estroma mielosuportivo com capacidade de sustentar a hematopoese, identificando, assim, a multipotencialidade dessas células (FRIEDENSTEIN et al., 1974).

Por fim, com o objetivo de testar o potencial de diferenciação individual de cada colônia, os pesquisadores verificaram que as CFU-Fs eram heterogêneas, com algumas sendo capazes de gerar apenas osso (unipotente), enquanto outras geraram osso, adipócitos e estroma mielosuportivo (multipotente) (OWEN e FRIEDENSTEIN, 1988). Dessa forma, estabeleceu-se o conceito de que as CFU-Fs constituem uma mistura de células progenitoras em estágios distintos de diferenciação, geradas a partir de uma célula-tronco multipotente, que, à época, foi denominada “célula-tronco estromal” (OWEN, 1988; BIANCO et al., 2013). Esta observação foi confirmada mais recentemente por Sworder e colaboradores, que demonstraram que cerca de 10-20% das CFU-Fs são multipotentes, enquanto o restante é unipotente (SWORDER et al., 2015).

Em 2006, devido ao aumento significativo no interesse clínico, biológico e crescente número de estudos envolvendo o uso dessas células, a Sociedade Internacional de Terapia

Celular (ISCT - *International Society of Cell Therapy*) instituiu critérios mínimos para sua caracterização *in vitro*. De acordo com o relatório, para que sejam consideradas como células estromais da medula óssea, essas células devem: (i) ser aderentes ao plástico de cultivo quando mantidas em condições de cultura padrão, (ii) devem expressar os antígenos de superfície CD73, CD90 e CD105 e não expressar os marcadores CD11b ou CD14, CD19 ou CD79a, CD45, CD34 e moléculas de superfície HLA-DR; e (iii) devem ser capazes de se diferenciar *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006).

No entanto, a caracterização completa da identidade das células multipotentes, atualmente denominadas “células-tronco esqueléticas” (*Skeletal Stem Cells*, SSCs), ainda permanece desconhecida. Igualmente, desconhece-se a hierarquia dos progenitores derivados das SSCs e características específicas que permitam seu subfracionamento. Dessa forma, os estudos da área continuam utilizando a fração aderente total da medula, isto é, as BMSCs, que hoje sabemos que representam um conjunto de células altamente heterogêneas, contendo tanto as células multipotentes (SSCs), como progenitores em distintos estágios de diferenciação e células terminalmente diferenciadas (KREBSBACH et al., 1999; STRONCEK et al., 2014; ROBEY et al., 2014, 2015; HOLZWARTH et al., 2018).

## **1.7 Terapia com células estromais da medula óssea**

Neste contexto, devido à facilidade do isolamento, cultivo, expansão, e ao potencial osteogênico intrínseco das BMSCs, foram apontadas como as melhores candidatas para à bioengenharia de tecidos ósseos (ARVIDSON et al., 2011). O potencial biológico das BMSCs vem sendo explorado em protocolos para a regeneração de tecidos, como na consolidação de fraturas, lesões tendíneas e cartilagosas (MOUTSATSOS et al., 2001; AWAD et al., 1999; QUINTAVALLA et al., 2002). Desde então, muitos estudos avaliaram sua efetividade

terapêutica no contexto ortopédico (KREBSBACH et al., 1999; QUARTO et al., 2001; HERNIGOU et al., 2005; AGATA et al., 2009; KIM et al., 2009; BEYTH; SCHROEDER; LIEBEGALL, 2011; EL HADDAD, 2011; MÉNARD; TARTE, 2013). No entanto, apesar desses esforços contínuos, nenhum tratamento com BMSCs foi estabelecido (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017).

Embora as terapias baseadas em BMSCs sejam muito promissoras, os resultados clínicos observados são variáveis. A inconsistência nos resultados pode decorrer de uma não definição das populações de células aplicadas, das variações de protocolos utilizados para a produção dessas células, da heterogeneidade entre os pacientes ou de uma incompleta compreensão da dose utilizada (JIANG; XU, 2020).

Na literatura, observa-se protocolos usando de  $4,0 \times 10^7$  a  $1,2 \times 10^9$  células, e assim, o tecido receptor é inundado com um número suprafisiológico de células, o que não ocorre naturalmente em um organismo adulto (WANG; YI; SONG, 2021). Nesse contexto, as células devem manter a viabilidade e migrar para a área lesionada, para desempenhar seu papel de promover a regeneração tecidual (ZHANG et al., 2018; JIA et al., 2015). Outro aspecto crítico das atuais terapias com células é o curto tempo de vida das BMSCs que são inseridas no tecido lesionado. A maioria das BMSCs transplantadas morrem logo após a aplicação, não se integrando e nem se dividindo (GARCÍA-BERNAL et al., 2021) e, portanto, não fornece mais células capazes de promover a formação de novos tecidos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a agência reguladora correspondente dos EUA (*Food and Drug Administration* ou FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency* ou EMA) atribuíram as BMSCs a conotação de “Produto de Terapia Avançada”, com base nas propriedades de imunomodulação e diferenciação dessas células (TORRE et al., 2015). No entanto, as aplicações terapêuticas das

BMSCs levantam uma série de questões sobre a segurança da administração em seres humanos de células expandidas *in vitro*, principalmente no que diz respeito à estabilidade genética e risco de surgimento de tumores (WANG et al., 2012; MENDICINO et al., 2019; FANG; VANGSNESS, 2021).

De fato, a instabilidade genética já foi demonstrada em células tronco murinas expandidas *in vitro* (LUKOMSKA et al., 2019). Quanto às BMSCs humanas, foi demonstrado que elas não têm aptidão para a transformação espontânea e podem ser expandidas com segurança *in vitro* por até 44 passagens, sem qualquer sinal de imortalização ou desenvolvimento de anomalias cromossômicas (BERNARDO et al., 2007).

De fato, até 2016, existiam mais de 2000 pacientes que haviam utilizado as BMSCs para tratamento das mais diversas doenças e a grande maioria dos ensaios clínicos não relataram aparecimento de tumores ou problemas complexos de saúde associados às BMSCs (SQUILLARO; PEWSO; GALDERISI, 2016). Por fim, a aplicação terapêutica das BMSCs com segurança requer o estabelecimento de (i) regularização dos centros de terapia celular de acordo com os padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), protocolos de expansão celular validados e por até no máximo 10 passagens; (ii) condições de boas práticas de fabricação para produção das células; (iii) testes de controle de qualidade do produto celular; e (iv) avaliação e acompanhamento clínico dos receptores. O cumprimento desses requisitos pode garantir a segurança e o sucesso clínico da aplicação terapêutica dessas células (WANG et al., 2012; LUKOMSKA et al., 2019).

## **1.8 Uso de BMSCs no contexto da bioengenharia ortopédica**

A bioengenharia é um campo multidisciplinar onde são aplicados conhecimentos da ciência clínica, biologia, engenharia, transplante de células e ciência de materiais para criar



novos biomateriais que irão interagir com sistemas biológicos para tratar, regenerar ou substituir tecidos danificados (SOUCACOS; JOHNSON; BABIS, 2008). Normalmente, a bioengenharia envolve o uso de células, fatores bioativos e *scaffolds*, que são capazes de fornecer suporte estrutural para as células aderirem, se multiplicarem, se diferenciarem e formarem novos tecidos (PEREZ et al., 2018).

Quanto a sua propriedade como célula-tronco/progenitora, as BMSCs são exploradas, principalmente, no contexto ortopédico. O sucesso de protocolos de regeneração do tecido ósseo depende essencialmente da ação de quatro componentes: sinalização por moléculas que induzem a formação óssea, como por exemplo, as proteínas morfogenéticas do osso (*Bone Morphogenetic Proteins* ou BMPs) (FAYAZ et al., 2011; ATALA, 2012); a existência de uma estrutura que permita ou possibilite a formação óssea, como a hidroxiapatita sintética ou  $\beta$ -tricálcio fosfato (DE LONG JR, 2007; FELLAH et al., 2008); o recrutamento e a atividade de células osteoprogenitoras e os estímulos mecânicos (WANG et al., 2013; TROUNSON et al., 2011; GIANNOUDIS; EINHORN; MARSH, 2007). As BMSCs são candidatas para utilização em terapias de regeneração óssea devido às suas propriedades biológicas únicas, como a osteogenicidade inata e a capacidade de promover a reposição da massa óssea ao longo da vida (ROSSET; DESCHASEAUX; LAYROLLE, 2014).

Na primeira série de casos clínicos, Quarto e colaboradores (2001) demonstraram a viabilidade da associação de biomateriais celularizados com BMSCs autólogas expandidas *in vitro* como alternativa aos enxertos ósseos autólogos para o tratamento de defeitos segmentares em ossos longos. O tratamento foi proposto pela falta de resposta ao tratamento cirúrgico convencional ou pela falta de osso autólogo para preencher o defeito. Após 6 a 7 anos de seguimento dos mesmos casos, os implantes estavam totalmente incorporados e não houve

nenhum relato de complicação ou de evento adverso relacionado com as células (MARCACCI et al., 2007).

Gómez-Barrena e colaboradores (2019) realizaram o primeiro estudo clínico multicêntrico com BMSCs autólogas, expandidas *in vitro* associadas a biomaterial sintético, para tratar defeitos de consolidação de fraturas em ossos longos. Vinte e oito pacientes com fraturas não consolidadas no fêmur, tíbia e úmero foram recrutados na França, Espanha, Alemanha e Itália e tratados com 100 a 200 milhões de BMSCs associadas com 5 a 10 g de biocerâmica. Depois de um ano de acompanhamento, não foi observado nenhum evento adverso relacionado com o uso das células. Embora o objetivo do estudo tenha sido avaliar a segurança do tratamento e a reprodutibilidade nos quatro centros do protocolo de expansão, os autores observaram altas taxas de eficácia clínica do tratamento (92,8% ou 26/28 pacientes) (GÓMEZ-BARRENA et al., 2019).

Além dos materiais sintéticos, outro biomaterial vem ganhando bastante espaço no campo da bioengenharia ortopedia, os aloenxertos e a matriz óssea desmineralizada (DINOPOULOS; GIANNOUDIS, 2006). Lucarelli e colaboradores (2005) utilizaram aloenxerto associado com células estromais e plasma rico em plaquetas para tratar defeito diafisário no metatarso de ovelhas. Os autores observaram neoformação e remodelação óssea maior nos animais tratados com enxertos celularizados do que nos aloenxertos sem BMSCs. Nesse contexto, trabalhos anteriores mostraram que aloenxertos semeados com células estromais da medula óssea parecem acelerar a cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico em ratos (KANDAL et al., 2016). Por fim, recentemente, Frutos e colaboradores (2020) descreveram que o uso de BMSCs expandidas *in vitro* associadas a aloenxertos se mostrou uma técnica viável, segura e eficaz para artrodese da coluna e sem relato de efeito adverso.

Apesar de todos os avanços, observamos que na bioengenharia ortopédica a incidência de fraturas, pseudoartrose e reabsorção de aloenxerto ainda é de grande preocupação. Sendo assim, novas opções de tratamento precisam ser propostas para melhorar a consolidação de fraturas. No entanto, no aspecto humano pouco se sabe sobre as vantagens da associação de BMSCs com aloenxertos e se, fornecem uma opção para o tratamento de defeitos ósseos.

## **2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

---

A regeneração óssea é o processo fisiológico responsável pela consolidação de fraturas. No trauma ortopédico, existem condições clínicas complexas e desafiadoras, nas quais a regeneração óssea é insuficiente. Atualmente, possuímos um enorme saber a cerca da regeneração óssea no âmbito micro e macro biológico, no entanto, urge a necessidade de transferir esses conhecimentos adquiridos para avanços das terapias na prática clínica. Assim, consideramos que a associação do aloenxerto às BMSCs possa reproduzir um material biologicamente semelhante ao enxerto autólogo, mimetizando o microambiente do tecido ósseo e auxiliando o processo de neoformação óssea.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo principal

Analisar o potencial osteogênico do aloenxerto associados com células estromais da medula óssea expandidas *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos deste trabalho, podemos citar:

- Isolar, expandir e caracterizar as BMSCs dos participantes do estudo;
- Estabelecer e avaliar o protocolo de adesão das BMSCs ao aloenxerto;
- Avaliar *in vitro* o potencial osteogênico dos aloenxertos celularizados com BMSCs;
- Avaliar *in vivo*, em modelo animal o potencial osteogênico dos aloenxertos celularizados com BMSCs;
- Avaliar quantitativamente e qualitativamente a neoformação óssea nos aloenxertos celularizados com BMSCs.

## 4 METODOLOGIA

---

### 4.1 Aspectos éticos

Trata-se de um estudo intervencional longitudinal prospectivo, com pesquisa experimental *in vitro* e *in vivo*, realizado no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), que foi elaborado de acordo com a declaração de Helsinki. O desenho do estudo, os procedimentos utilizados para sua execução e a coleta de amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO, registrado sob o processo CAAE nº 21778619.9.0000.5273 (Anexo A). Todos os doadores incluídos foram informados sobre o procedimento de coleta das amostras biológicas e esclarecidos sobre os objetivos desse estudo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) necessário para a coleta do material biológico foi obtido de forma voluntária, de acordo com as normas da resolução nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo G).

A utilização de animais e a realização de todos os experimentos com os mesmos, estavam de acordo com os princípios éticos e normas da resolução nº 33 de 18/11/2016 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Lei nº 11.794, de 08/10/2008 (BRASIL, 2008) e do *International Guiding Principles for Research Involving Animals* (BANKOWSKI et al., 1984), tendo sido previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INTO, registrado sob o processo nº 008/2019 (Anexo B).

### 4.2 Seleção dos participantes da pesquisa e composição da amostra

Para esse estudo foram utilizados descartes cirúrgicos de osso esponjoso proveniente de cinco pacientes selecionados no Centro de Atenção Especializada do Trauma Ortopédico

Adulto ou do Centro de Atenção Especializada de Cirurgia do Quadril do INTO, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, tratados com artroplastia total do quadril primária, submetidos ao procedimento cirúrgico no período entre fevereiro/2020 e janeiro/2021.

Foram definidos como critérios de exclusão do estudo: pacientes incapazes de entender e aceitar, mediante assinatura, o TCLE, e com registro e/ou histórico de: doenças displásicas da medula óssea, doenças reumáticas, diabetes, artrite reumatoide, neoplasias malignas, uso prolongado ou crônico de glicocorticóides, em tratamento com quimioterápicos e/ou imunossupressores, tabagismo, dependência química e/ou alcóolica, gravidez corrente, síndromes genéticas, sorologia positiva para os vírus HBV (Hepatite B), HCV (Hepatite C), HIV1/2, HTLV 1/2 e citomegalovírus, infecção com *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculose) e *Treponema palidum* (Sífilis), e/ou com qualquer infecção local ou sistêmica no ato da cirurgia. Os critérios de seleção dos doadores estavam de acordo com o determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 153, de 14/06/2004, para seleção de doadores de sangue.

Para os experimentos usando modelo animal foram utilizados camundongos imunodeficientes (C57BL/6. Cg-Foxn1nu) com oito semanas de idade, de ambos os sexos, e com peso médio de  $30\text{g} \pm 5\text{g}$ . Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $55\% \pm 10\%$ ) e luminosidade (ciclos de 12 horas claro / escuro), em gaiolas individualizadas de polipropileno, forradas com maravalha, alimentados com ração padrão e água fornecida *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do INTO, que dispõe de estrutura física apropriada para a criação de animais imunodeficientes.

### **4.3 Coleta das amostras**

Foram utilizados como fonte de medula óssea descartes cirúrgicos de osso esponjoso. A captação das amostras foi realizada no centro cirúrgico durante o ato operatório. Após a fresagem do fundo acetabular, foram coletados os fragmentos ósseos removidos pelas três últimas fresas. As amostras foram acondicionadas em um frasco estéril de 50 mL e imediatamente encaminhada à temperatura ambiente para o Centro de Processamento Celular (CPC) do INTO (figura 7).

### **4.4 Isolamento e expansão das células estromais da medula óssea**

O isolamento e a expansão das BMSCs, que foram utilizadas para a celularização dos aloenxertos e substitutos ósseos, obedeceram às normativas de boas práticas da ANVISA, das RDC nº 214/2018 e RDC nº 508/2021. Todo o processo de expansão celular foi realizado no CPC do INTO.

#### **4.4.1 Isolamento celular**

O processo de isolamento das células estromais da medula óssea foi iniciado imediatamente após o recebimento do material. As amostras de osso esponjoso (figura 7) foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL (Corning, Nova York, Estados Unidos) e diluídas com solução salina tamponada com fosfato (PBS - *Phosphate Buffer Solution*, AMRESCO, Ohio, Estados Unidos) em uma proporção de até três vezes o seu volume, e lavadas com PBS por até três vezes para dissociar mecanicamente o conteúdo medular dos fragmentos ósseos. Após este processo e sedimentação das espículas ósseas, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo cônico de 50 mL. O material foi centrifugado a  $300 \times g$  por cinco



minutos e a seguir as células foram ressuspensas em meio de cultivo *α-Minimum Essential Medium* ( $\alpha$ -MEM, LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS - *Fetal Bovine Serum*, Gibco Life Technologies, Massachusetts, Estados Unidos).

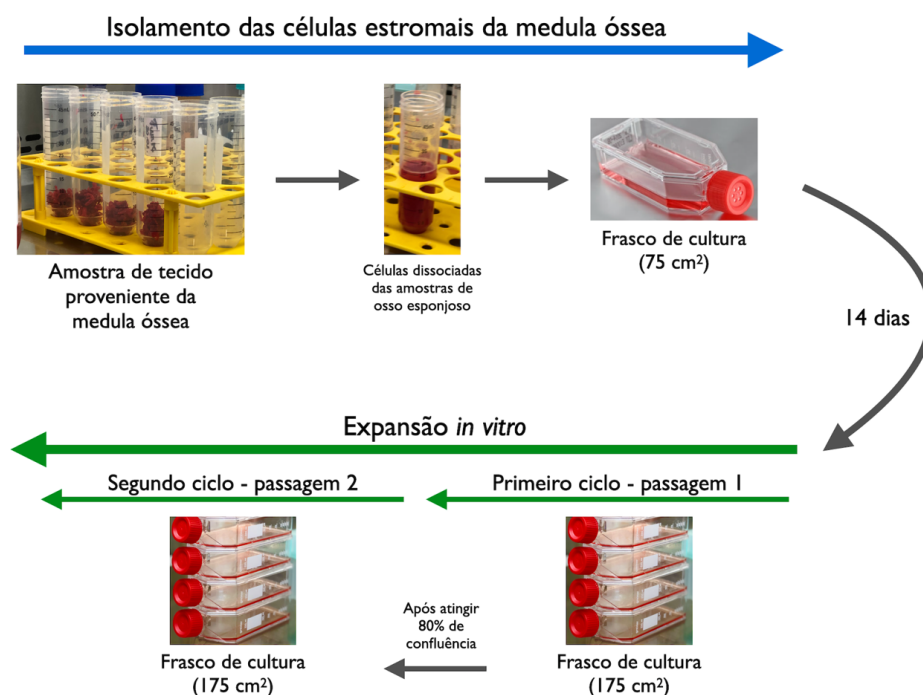
As células ressuspensas foram diluídas na proporção de 1:10 v/v em solução de Turk (ácido acético a 2%; Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) para lise de hemácias, e o quantitativo de células mononucleadas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio invertido Eclipse TS100 (Nikon, Tóquio, Japão). Em seguida, as células mononucleadas isoladas foram distribuídas em frascos de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, Nova York, Estados Unidos) na densidade de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em 10 mL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS, em triplicata e mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade, por três dias. Após este período, as células não aderentes foram removidas, e o meio de cultivo foi trocado. As células aderentes foram mantidas incubadas por mais onze dias. Ao final desta etapa, foram separadas em duas alíquotas, uma para o processo de expansão celular e outra para a caracterização das células e controle de qualidade (DIAS et. al., 2019).



**Figura 7: Amostra de osso esponjoso.** Descarte cirúrgico de osso esponjoso (raspado acetabular) proveniente de artroplastia total de quadril, que foram utilizados como fonte de medula óssea.

#### 4.4.2 Expansão *in vitro*

As células obtidas na fase de isolamento foram submetidas a dois ciclos de expansão *in vitro* (passagens). Nas duas passagens, as células foram distribuídas em frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>, na densidade de  $8,5 \times 10^3$  células / cm<sup>2</sup>, em  $\alpha$ -MEM com 20% de FBS, incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 80% de umidade, com o meio trocado a cada três dias. Após atingirem 80% de confluência, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por oito minutos com 10 mL com solução de tripsina recombinante (Tryple express, Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos). O total de células obtidas (células viáveis e não viáveis) foi determinado com auxílio de uma câmera de Neubauer, pelo método de exclusão por Azul de Tripán. As BMSCs foram expandidas até a terceira passagem e então, conduzidas para análises laboratoriais, quando foi considerado encerrado o processo de expansão, exemplificado na figura 8 (DIAS et. al., 2019).



**Figura 8: Processo de isolamento e expansão das BMSCs.** Ilustração das etapas de produção. Primeira fase/isolamento celular: células distribuídas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> e cultivadas durante 14 dias. Segunda fase/expansão *in vitro*: células distribuídas em frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>.

## 4.5 Caracterização das BMSCs

As BMSCs foram caracterizadas quanto aos parâmetros definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*): capacidade de adesão ao frasco de cultura celular padrão, potencial de formação de colônias fibroblastóides, perfil de expressão de marcadores de superfície celular específicos e a capacidade de diferenciação *in vitro* para as vias osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006).

### 4.5.1 Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides

A frequência de progenitores estromais nas amostras de medula óssea foi determinada pelo ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides (CFE). Após a dissociação mecânica, durante o processo de isolamento das células, um quantitativo de  $2,0 \times 10^5$  células da suspensão foi semeado em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, com 5 mL de  $\alpha$ -MEM com 20% de FBS e incubadas na estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por três dias para adesão celular. Após este período, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultivo  $\alpha$ -MEM com 20% de FBS foi trocado. No 14° dia, as colônias foram lavadas com PBS, fixadas com solução de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) por 15 minutos e coradas com solução aquosa Cristal Violeta a 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) por 30 minutos. Em seguida as garrafas foram lavadas com água corrente e secas à temperatura ambiente, e o número das colônias foi mensurado. Somente as unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, *colony forming units fibroblast*) com mais de 50 células fibroblastóides foram contabilizadas (KUZNETSOV et al., 2009; ROBEY et al., 2014).

#### 4.5.2 Perfil de expressão de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo

Ao final do processo de expansão celular, um total de  $1,0 \times 10^6$  células foram incubadas, por tubo de análise, com os seguintes anticorpos primários conjugados a fluorocromos: anti-CD73 conjugado a APC; anti-CD146 conjugado a PE; anti-CD105 conjugado a FITC; anti-CD90 conjugado a Percp-Cy5.5 (todos da BD Biosciences, Franklin Lakes, Estados Unidos); anti-CD34 conjugado a FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca); anti-CD14 conjugado a FITC; anti-CD45 conjugado a Percp-Cy5.5 (clone D3/9) (ambos da Immunostep, Salamanca, Espanha); anti-CD11b conjugado a PE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA); isotipo controle IgG2A FITC; isotipo controle IgG1A APC; isotipo controle IgG1A Percp-Cy5.5; isotipo controle IgG1 PE; isotipo controle IgG1 FITC; isotipo controle IgG2A PE (todos da Santa Cruz Biotechnology). Todas as marcações foram realizadas separadamente e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com PBS suplementado com 3% de FBS. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz, a imunorreatividade para cada marcador CD (*cluster of differentiation*) foi detectada usando o citômetro de fluxo Accuri<sup>®</sup> (Becton Dickinson – BD, California, Estados Unidos). Os dados foram analisados utilizando o FlowJo<sup>™</sup> v10 Software (BD Life Sciences, New Jersey, Estados Unidos). Amostras com valores de CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> e CD146<sup>+</sup> inferiores a 95% e de CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> acima de 2% foram descartadas (ROCHA et al., 2017).

#### 4.5.3 Avaliação do potencial de diferenciação *in vitro* das BMSCs

Para avaliar o potencial de diferenciação das BMSCs, foram realizados ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica no final do processo de expansão celular.

#### 4.5.3.1 Ensaio de diferenciação osteogênica *in vitro*

As BMSCs foram plaqueadas em seis poços com  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> por poço, em placas de 24 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Destes, três poços foram tratados com meio de cultivo osteogênico, isto é,  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS, contendo 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e  $10^{-6}$ M de dexametasona (todos da Sigma-Aldrich). As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 21 dias, com troca de meio a cada três dias. O controle negativo foi realizado nos três poços restantes, sendo colocado apenas o meio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS. No 21º dia, o meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com 500  $\mu$ L de PBS, as células foram fixadas com 200  $\mu$ L de solução de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente e incubadas com solução aquosa de nitrato de prata à 2% (Sigma, Missouri, Estados Unidos) por 40 minutos protegidas da luz. Ao termino, as células foram lavadas três vezes com água destilada e expostas à luz UV por 10 minutos. Os poços foram fotografados usando microscópio EVOS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) (DIAS et. al., 2019).

#### 4.5.3.2 Ensaio de diferenciação adipogênica *in vitro*

As BMSCs foram plaqueadas em seis poços com  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> por poço, em placas de 24 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Destes, três poços foram tratados com meio de cultivo adipogênico, isto é,  $\alpha$ -MEM com 20% FBS, contendo 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX),  $10^{-6}$  M de dexametasona, 200 mM de indometacina (todos da Sigma-Aldrich) e 10 mM de insulina (Humulin<sup>®</sup>, Lilly, São Paulo, Brasil). O controle negativo foi realizado nos três poços restantes, sendo colocado apenas o meio de cultivo  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS. A troca de meio foi realizada a cada três dias, por 21

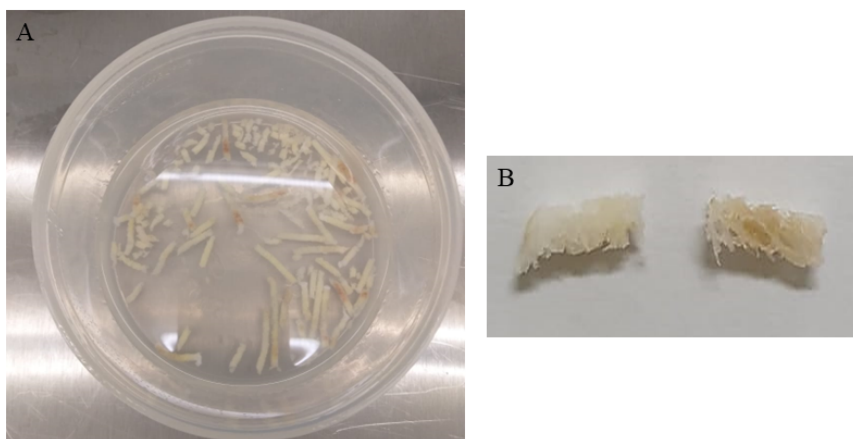
dias. No 21º dia, para verificar a diferenciação adipogênica, o meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com 500 µL de PBS. As células foram fixadas com 200 µL de solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente, lavadas com propileno glicol PA (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) e incubadas com solução Oil Red O 0,5% (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) em propileno glicol por 20 minutos para coloração. Após duas lavagens com 85% de propileno glicol, as células foram fotografadas usando microscópio EVOS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) (DIAS et. al., 2019).

#### 4.5.3.3 Ensaio de diferenciação condrogênica *in vitro*

Para a diferenciação condrogênica, um total de  $1,0 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 10 µL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% FBS, em seguida, 10 µL das células foram inoculadas em formato de gota, em placa de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para a formação de uma micromassa. Após 30 minutos, 100 µL do meio de diferenciação condrogênica StemPro® (Gibco Life Technologies, Nova York, Estados Unidos) foram adicionados aos poços e para o controle negativo, em três poços foram colocados 100 µL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS. No 21º dia, o meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS e as micromassas formadas foram fixadas com 50 µL de solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) por três horas, à temperatura ambiente, e coradas com Alcian Blue (Sigma). As lâminas foram fotografadas usando microscópio EVOS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) (DIAS et. al., 2019).

#### 4.6 Preparo do aloenxerto

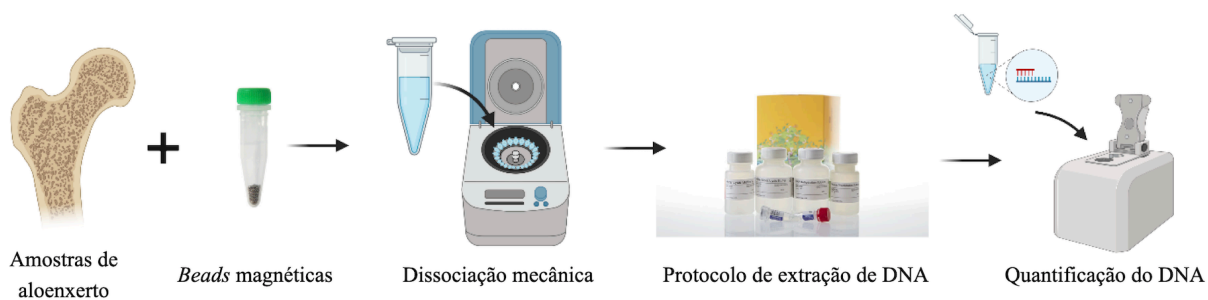
No laboratório do CPC, o aloenxerto proveniente do banco de multitecidos do INTO foi descongelado à temperatura ambiente e colocado em uma cuba metálica com solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%) durante 30 minutos. Em seguida, o osso foi posicionado em uma prensa e com auxílio de uma agulha de biópsia óssea, calibre 8G × 152 mm (T-handle Jamshidi™, Becton Dickinson, Ontário, Canadá), foram extraídos fragmentos cilíndricos de 30 mg (figura 9). Por fim, o material foi mergulhado em álcool absoluto e soro fisiológico 0,9% de NaCl, com antibiótico (vancomicina 10 mg / mL). Após o processamento, os fragmentos ósseos foram acondicionados em tubos cônicos de 1,5 mL e estocados à -80°C até serem utilizados ou imediatamente designados para avaliação da qualidade de descelularização, por quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e histologia (RASCH et al., 2019).



**Figura 9: Fragmentos cilíndricos de aloenxerto.** (A) Fragmentos de aloenxerto processados; (B) Dois fragmentos de aloenxerto com 30 mg.

#### 4.7 Quantificação do DNA presente nos aloenxertos

Para validação do processo de descelularização do aloenxerto, foi avaliada a quantidade de DNA presente na amostra. Os fragmentos de aloenxertos foram incubados com solução de lise do kit *Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification* (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) em banho maria a 55°C por 12 horas. No dia seguinte, pequenas esferas (*beads*) magnéticas foram colocadas nos tubos cônicos de 1,5 mL e o tecido foi fragmentando com auxílio de um disruptor de tecidos (L-Beader 24, Loccus, São Paulo, Brasil) por quatro ciclos de 3733 rpm por 40 segundos. Após essas etapas, a extração de DNA seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante do kit (*Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit*). A quantidade de DNA extraído de 30 mg de tecido foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Como controle positivo foi usado DNA extraído de saliva humana (figura 10). Os valores foram expressos em ng /  $\mu$ L (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).



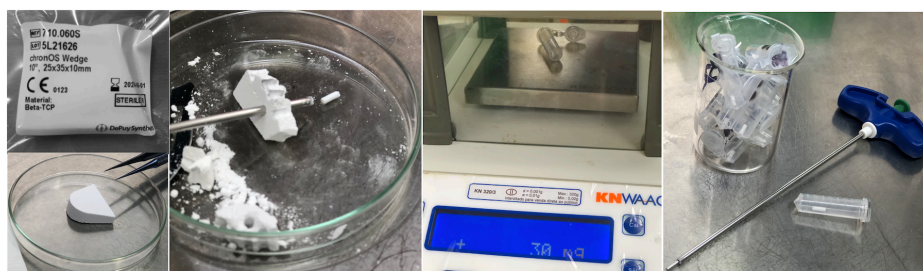
**Figura 10: Quantificação de DNA nos aloenxertos.** Etapas do protocolo para extração de DNA.

#### 4.8 Preparo do $\beta$ -TCP

Para realização dos experimentos, utilizamos como controle um substituto de enxerto ósseo comercialmente disponível, o beta-tricálcio fosfato sintético ( $\beta$ -TCP, ChronOS<sup>®</sup>,



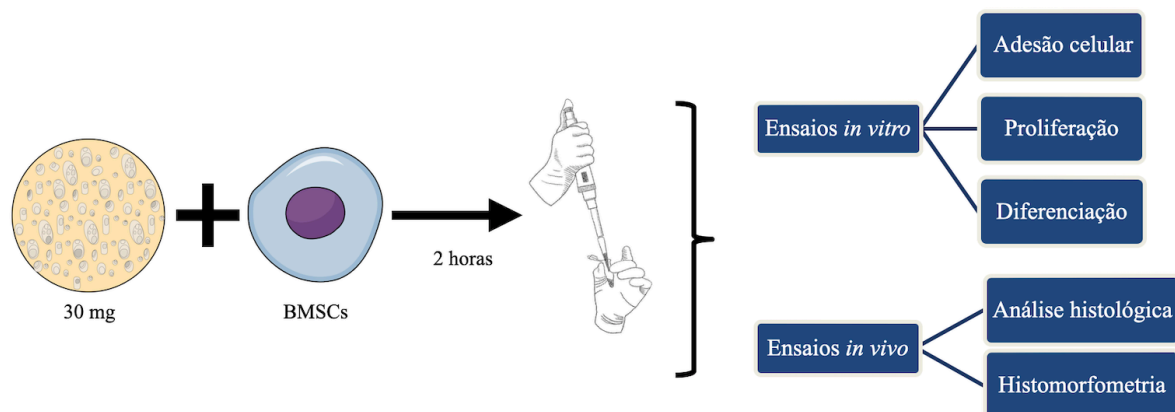
Synthes, Oberdorf, Suíça) com porosidade de 60%, tamanho de poro de 100 a 500  $\mu\text{m}$  e biodegradabilidade moderada (SEEBACH et al., 2012). Sendo assim, com auxílio de uma agulha de biópsia óssea, calibre 8G  $\times$  152 mm (T-handle Jamshidi™, Becton Dickinson, Ontário, Canadá), foram extraídos fragmentos cilíndricos de 30 mg (figura 11). Os fragmentos cilíndricos foram armazenados em tubos cônicos de 1,5 mL estéreis até serem designados para análise por MEV ou para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 11: Preparo do  $\beta$ -TCP.** Fragmentos cilíndricos obtidos com agulha de biópsia, pesados e armazenados.

#### 4.9 Celularização dos *scaffolds* com BMSCs

A quantidade de células utilizada no processo de celularização foi padronizada, de modo que  $1 \times 10^6$  BMSCs foram inoculadas com 30 mg de *scaffold*, isto é, 30 mg de aloenxerto ou 30 mg de  $\beta$ -TCP (ChronOS®). Para adesão, as BMSCs foram homogeneizadas individualmente com *scaffolds* e mantidas sob agitação a 250 rpm (mesa agitadora orbital, Tecnal, São Paulo, Brasil) por duas horas. Após este período, parte do material foi encaminhado para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, conforme ilustrado na figura 12 (DIAS et al., 2019).



**Figura 12: Celularização dos aloenxertos e  $\beta$ -TCP.** 30 mg do aloenxerto ou  $\beta$ -TCP foram incubados com as BMSCs por duas horas, em seguida, esse material foi analisado quanto sua capacidade de: adesão, proliferação e diferenciação (ensaios *in vitro*); e estímulo a neoformação óssea através da histologia e histomorfometria (ensaios *in vivo*).

#### 4.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material foi fixado com glutaraldeído 2,5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão cacodilato de sódio 0,1M por duas horas e pós-fixado com solução de 1% de tetróxido de ósmio por 30 minutos, com o quantitativo suficiente para cobrir toda amostra. Em seguida, o material foi desidratado em série de álcool etílico (Sigma-Aldrich) com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Ao final da desidratação, as amostras foram mergulhadas em solução alcoólica de hexametildissilano (HMDS - Sigma-Aldrich), 1:1 (v/v), por 30 minutos, seguida de mais 30 minutos de incubação com solução pura de HMDS. Após esse período, as amostras foram mantidas por 12 horas na capela para secagem, e foi realizado o processo de metalização com uma camada de espessura nanométrica de ouro. A aquisição e análise foram realizadas a uma tensão de 15 kV, em modo de baixo vácuo no microscópio eletrônico de varredura Quanta 400 (ThermoFisher, Oregon, Estados Unidos) do Centro de Caracterização em Nanotecnologia (CENANO) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT). A MEV foi realizada antes da celularização para avaliar a microestrutura dos *scaffolds* e a qualidade do preparo do aloenxerto.

Após a celularização com BMSCs, a MEV foi utilizada para avaliar a capacidade de adesão e a morfologia das células sob os aloenxertos e  $\beta$ -TCP.

#### **4.11 Ensaio *in vitro* de viabilidade e proliferação celular (ensaio CCK-8)**

Neste ensaio *in vitro*, seis alíquotas de cada amostra dos *scaffolds* celularizados foram incubadas em poços individuais, em placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), com  $\alpha$ -MEM com 20% FBS à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 14 dias. Este mesmo meio foi utilizado em poços controle, onde foram incubadas  $1,0 \times 10^4$  células, sem *scaffolds*. As análises de viabilidade e proliferação celular foram realizadas seguindo as especificações do fabricante do kit CCK-8 (*Cell Counting Kit 8*, Merck, Darmstadt, Alemanha). Para tal, em diferentes tempos (1º, 3º, 6º, 10º e 14º dia após adesão celular), 10  $\mu$ l da solução de CCK-8 foi adicionada ao poço e incubado por quatro horas à 37°C. Após este período, o meio de cultura foi coletado, e a absorbância foi detectada usando o espectrofotômetro Glomax (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) na faixa de comprimento de onda de 450 nm, com resultados expressos por densidade óptica (OD, *Optical Density*). Para prosseguir com a análises nos diferentes tempos, um novo meio de cultura foi adicionado aos poços. Para detectar diferenças da atividade metabólica celular, foram formados três grupos: grupo ALO<sup>BMSC</sup> (BMSCs associadas ao aloenxerto); grupo TCP<sup>BMSC</sup> (BMSCs associadas ao  $\beta$ -TCP); e o grupo CTL (BMSCs aderidas a placa de cultivo sem *scaffolds*) (LIU et al., 2019).

#### **4.12 Ensaio *in vitro* da capacidade de diferenciação osteogênica por fosfatase alcalina**

Neste ensaio, três alíquotas de cada amostra dos *scaffolds* celularizados foram acondicionados em poços individualizados, em placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), e incubados com meio de diferenciação osteogênico, isto é,

$\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS, contendo 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato, 5  $\mu$ g / mL de ácido ascórbico 2-fosfato e  $10^{-6}$ M dexametasona (todos da Sigma-Aldrich) pelo período de 14 dias. A atividade da enzima fosfatase alcalina foi avaliada nos dois grupos (ALO<sup>BMSC</sup> [aloenxerto + BMSCs] e TCP<sup>BMSC</sup> [ $\beta$ -TCP + BMSCs]), em tempos diferentes (no 7º e 14º dia) e de acordo com as especificações do fabricante do kit *Alkaline Phosphatase Diethanolamine Activity* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após a desfosforilação do substrato colorimétrico pNPP (p-nitrofenil fosfato), que produz uma coloração amarelada, a absorbância foi detectada usando o espectrofotômetro Glomax (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) na faixa de comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos por OD (KUEHLFLUCK et al., 2015; PERSSON et al., 2018).

#### **4.13 Ensaio *in vitro* da capacidade de diferenciação osteogênica por deposição de matriz mineralizada**

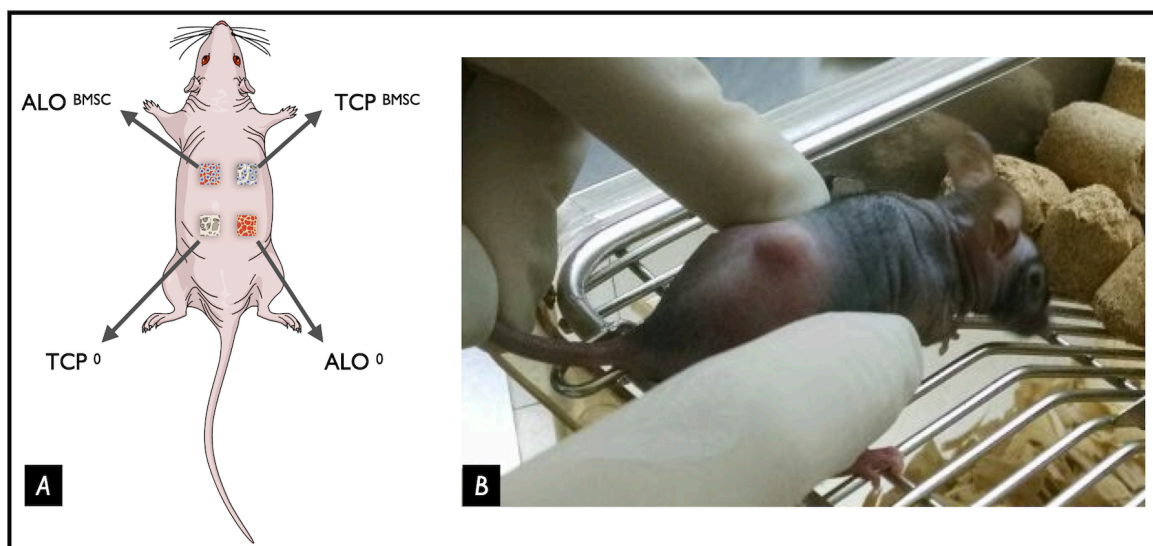
Neste ensaio, três alíquotas de cada amostra dos *scaffolds* celularizados (ALO<sup>BMSC</sup> [aloenxerto + BMSCs] e TCP<sup>BMSC</sup> [ $\beta$ -TCP + BMSCs]) foram acondicionados em poços individualizados, em placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) e incubados com meio de diferenciação osteogênico, isto é,  $\alpha$ -MEM suplementado com 20% de FBS, contendo 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato, 5  $\mu$ g / mL de ácido ascórbico 2-fosfato e  $10^{-6}$ M dexametasona (todos da Sigma-Aldrich) pelo período de 21 dias. No 21º dia, os *scaffolds* foram fixados com 500  $\mu$ L de solução de paraformaldeído a 4% por três horas e corados com o kit *Alizarin Red S Staining Quantification Assay* (ARed-Q Kit; ScienCell Research Laboratories, California, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. Para quantificar a deposição de matriz mineralizada, o vermelho de alizarina impregnado nos *scaffolds* foi eluído com 10% ácido acético e incubado a 85°C por 10 minutos. Em seguida, o

material foi mantido no gelo por cinco minutos, centrifugado a  $20000 \times g$  por 15 minutos. Após esta etapa, o ácido foi neutralizado com hidróxido de amônio a 10% e, por fim, a absorbância foi detectada usando o espectrofotômetro Glomax (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) na faixa de comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos por OD (GREGORY et al., 2004; KUEHLFLUCK et al., 2015).

#### 4.14 Avaliação *in vivo* do potencial osteogênico do enxerto celularizado

Para avaliar o potencial de formação óssea *in vivo*, os *scaffolds* celularizados foram implantados no subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes. Os enxertos implantados formaram quatro grupos, que foram denominados da seguinte forma: **ALO<sup>BMSC</sup>** (aloenxerto + BMSCs); **TCP<sup>BMSC</sup>** ( $\beta$ -TCP + BMSCs); **ALO<sup>0</sup>** (aloenxerto sem BMSCs, controle negativo do grupo **ALO<sup>BMSC</sup>**); **TCP<sup>0</sup>** ( $\beta$ -TCP sem BMSCs, controle negativo do grupo **TCP<sup>BMSC</sup>**) (figura 13 A). O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral, por via inalatória com isoflurano (indução do plano anestésico em 5% e durante o procedimento cirúrgico a 2%). Após testar os reflexos de cauda e confirmação do efeito anestésico, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e realizada a tricotomia da região dorsal. Depois da assepsia com álcool a 70%, foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 20 mm no dorso do animal, comprometendo a pele e o subcutâneo. Em seguida, o tecido foi divulsionado nas regiões paravertebral direita (superior e inferior) e esquerda (superior e inferior), sendo formadas bolsas subcutâneas, onde os implantes foram colocados em duplicatas, totalizando no máximo quatro implantes por animal, conforme apresentado na figura 13 A e B. Por fim, os planos subcutâneos e a pele foram fechados com um padrão simples de sutura com fio monofilamentar de nylon 5-0 Ethilon<sup>®</sup> (Ethicon, São Paulo, Brasil). No pós-operatório os animais receberam analgesia com cloridrato de tramadol, 12 mg/kg (Farmace,

São Paulo, Brasil), via subcutânea, duas vezes ao dia, por dois dias. Nos dias subsequentes, foram realizadas avaliações clínicas dos animais, sendo observado a presença ou não de infecção no local do procedimento e movimentação espontânea. Ao final de 12 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de inalação em câmara com CO<sub>2</sub>. Os implantes foram coletados para análise histológica.



**Figura 13: Avaliação *in vivo* do potencial osteogênico dos enxertos celularizados.** A: Ilustração da localização e distribuição dos implantes na região dorsal do camundongo. B: Camundongo com enxerto na região dorsal, com 12 semanas após a implantação.

#### 4.15 Processamento histológico

Todas amostras foram submetidas ao processamento histológico, onde os implantes foram fixados em paraformaldeído a 4% em PBS por 24 horas e descalcificados por três dias em solução de ácido nítrico (Vetec-Sigma-Aldrich) a 10%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool (Vetec-Sigma-Aldrich) por meio de concentrações crescentes (80%, 90%, 95% e 100%), clarificadas em xilol (Vetec-Sigma-Aldrich) e incluídas em parafina, para obtenção de cortes histológicos de 5 µm de espessura, utilizando o micrótomo RM2255 (Leica Biosystems, Baden-Württemberg, Alemanha). Na sequência, os cortes foram desparafinizados

em xilol, hidratados em série alcoólica em concentração decrescente (100%, 95%, 70% e água destilada) e corados pelas técnicas hematoxilina-eosina (H&E) e tricrômio de Goldner (ambos ScyTeK, Utah, Estados Unidos). Foram obtidos 10 cortes histológicos dos implantes coletados, sendo que, submetemos três cortes (3°, 6° e 9°) a coloração com H&E, os sete cortes restantes foram submetidos a coloração com tricrômio de Goldner. Todas as imagens das lâminas foram obtidas por digitalização com o *scanner* Aperio CS2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e analisadas no *software* Image-Scope (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

#### **4.16 Análise histomorfométrica do enxerto ósseo**

Para realização da análise histomorfométrica, foram utilizadas as imagens capturadas das lâminas coradas pela técnica de tricrômico de Goldner (EGAN; BRENNAN; PIGNOLO, 2012), as áreas de osso neoformado foram mensuradas usando o *software* ImageJ (*National Institutes of Health*, Maryland, Estados Unidos), através do *plugin* BoneJ versão 1.3 (<https://bonej.org>) e seguindo o protocolo estabelecido por Malhan e colaboradores. Todas as avaliações foram realizadas por um observador independente, cego em relação a configuração dos grupos. O volume total de osso novo produzido foi estimado com base em percentagem dentro da área avaliada (MALHAN et al., 2018).

#### **4.17 Análise estatística**

Os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais foram expressos sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foi adotado o intervalo de confiança de 95% para as análises, ou seja, foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada com o *software* GraphPad Prism (GraphPad versão 8.0, California, EUA). Para os dados referentes ao teste CCK-8, foi aplicado o teste ANOVA, para comparação entre os grupos

(dados não paramétricos), com pós-teste de Tukey. A análise estatística não paramétrica de Mann-Whitney foi realizada nos resultados dos testes com fosfatase alcalina. Aos dados referentes ao teste com vermelho de alizarina, foi aplicado o teste t de Welch. Para comparação de três amostras foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.



## 5 RESULTADOS

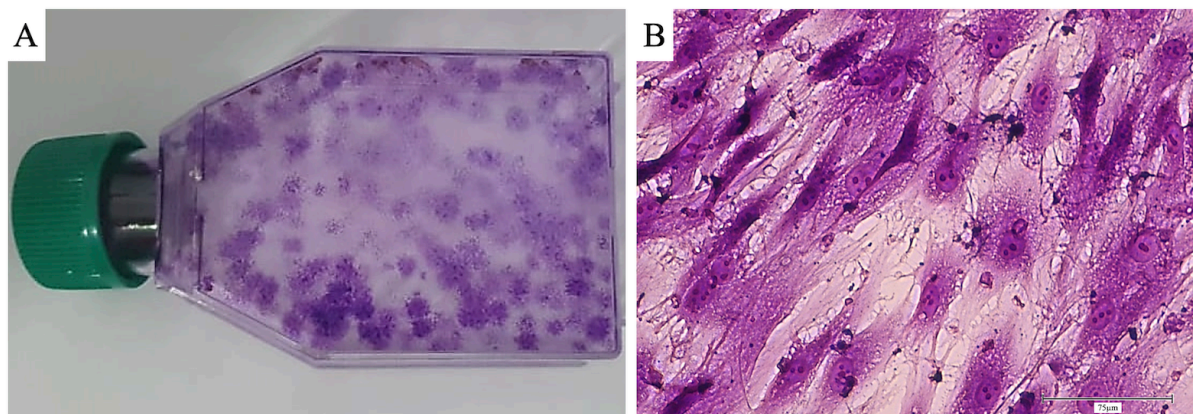
### 5.1 Características dos pacientes, análise de frequência das CFU-Fs e expansão das BMSCs

Para o presente estudo foram coletadas amostras de cinco pacientes, sendo quatro homens e uma mulher, com idade entre 37 e 74 anos (média de  $49,8 \pm 16,8$  anos). Uma das amostras não foi submetida ao processo de expansão celular, porque não obteve células suficientes para esta etapa. Inicialmente, com o intuito de estimar a frequência de células tronco esqueléticas das distintas amostras, realizamos o ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE). Notamos a formação de colônias com células de aspecto fibroblastóide (figura 14) e uma variação de 20 a 29,67 CFU-Fs a cada 100.000 células nucleadas (tabela 1) ( $p = 0,06$ ). Ainda no que diz respeito a capacidade de proliferação, observamos ao final da passagem 3, um rendimento médio de  $34,25 \pm 10,99 \times 10^6$  células com uma viabilidade média de  $94,77\% \pm 2,34\%$  (tabela 1).

**Tabela 1.** Dados das amostras.

Amostra	Idade (anos)	Sexo	Frequência de CFU ( $10^5$ )	Viabilidade (%)	Total de BMSCs ao fim de P3 ( $10^6$ )
01	37	M	21	98	50
02	61	F	20,33	95	25
03	74	M	20	93,2	33
04	40	M	29,67	92,9	29
05	37	M	x	x	x
<b>Média</b>	$49,8 \pm 16,8$		$22,75 \pm 4,63$	$94,77 \pm 2,34$	$34,25 \pm 10,99$

x = sem expansão celular; F = feminino; M = masculino; P3 = terceira passagem; n = 5.

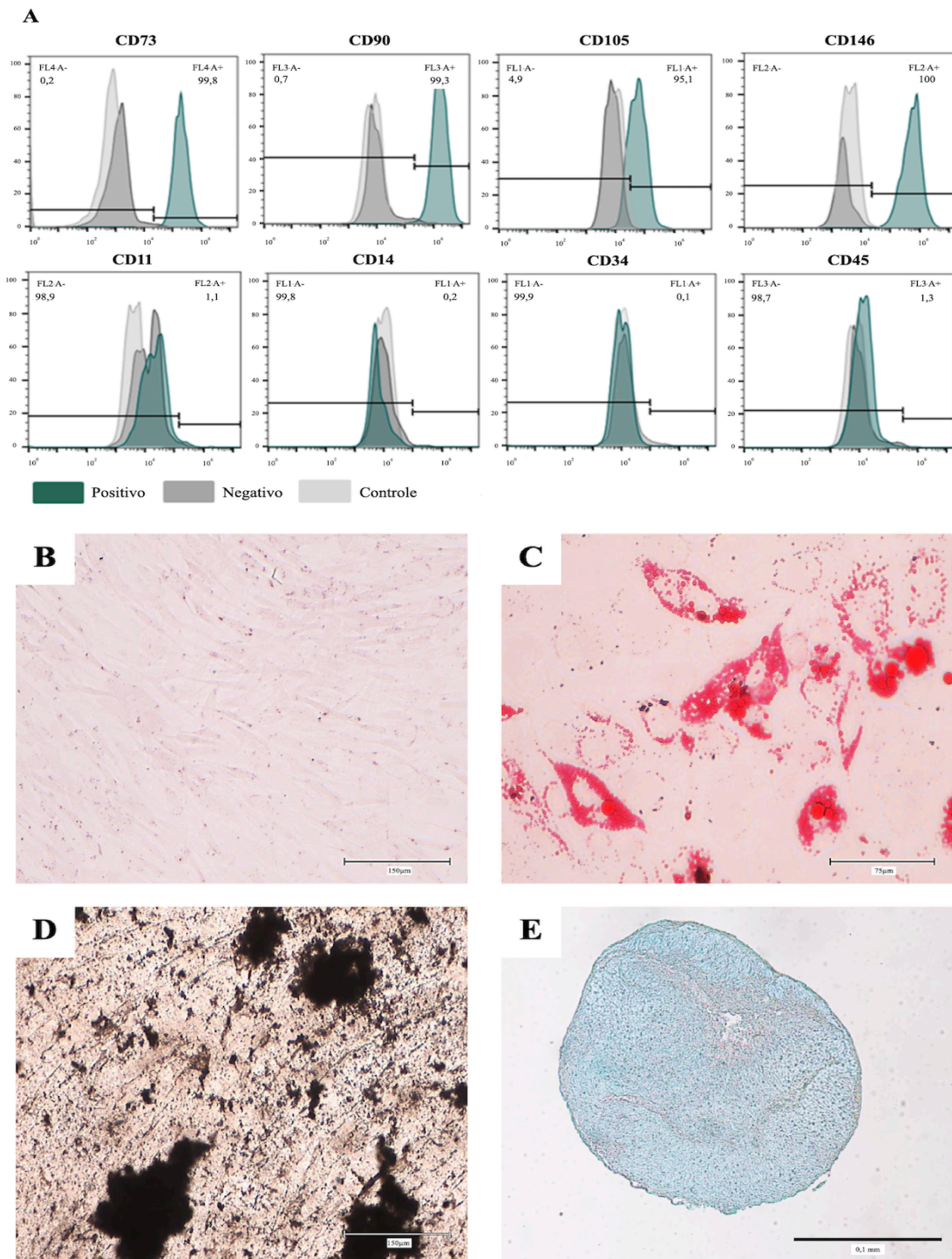


**Figura 14. Ensaio de eficiência de formação de colônias fibroblastóides (CFE).** (A e B) Imagens representativas das colônias originadas das distintas amostras.

## 5.2 Caracterização das BMSCs

Quanto a avaliação da expressão de marcadores de superfície relacionados à caracterização das células como BMSCs, a análise por citometria de fluxo revelou uma expressão superior a 95% dos marcadores clássicos (CD73, CD90, CD105 e CD146) e inferior a 2% dos marcadores da linhagem hematopoiética CD11b, CD14, CD34 e CD45 (figura 15 A).

Ainda com o intuito de concluir o processo de caracterização das BMSCs, as células foram induzidas *in vitro* para as vias adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas. Ao final das induções, observou-se que células da condição controle mantiveram a morfologia fibroblastóide, enquanto que nas outras células observou-se a formação de uma matriz mineralizada, fenótipo característico de osteoblastos, acúmulos lipídicos intracelulares, característicos de adipócitos e a formação de uma matriz rica em proteoglicanos, característico de condrócitos (figura 15 B-E). Em suma, esses resultados demonstram o sucesso do isolamento das células e confirmam a sua natureza como BMSCs.

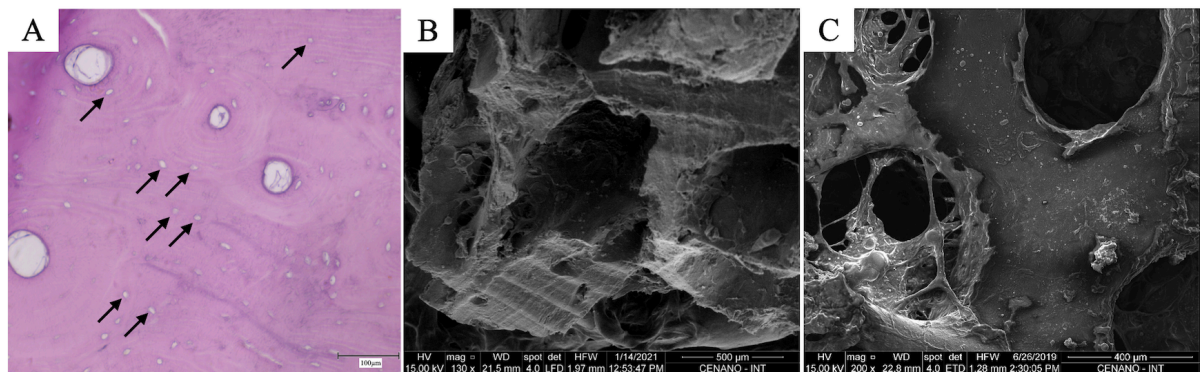


**Figura 15. Caracterização das BMSCs quanto a expressão de marcadores de superfície celular e quanto a sua capacidade de diferenciação *in vitro*.** (A) Histogramas de citometria de fluxo representativos (BMSCs da amostra 01) demonstram as percentagens de células que expressam os marcadores de superfície  $CD73^+$ ,  $CD90^+$ ,  $CD105^+$ ,  $CD146^+$ ,  $CD11^-$ ,  $CD14^-$ ,  $CD34^-$  e  $CD45^-$ . (B-E) Avaliação do potencial de diferenciação *in vitro* das BMSCs; (B) BMSCs indiferenciadas, não induzidas; (C) Acúmulo de vacúolos lipídicos intracelular em BMSCs induzidas à diferenciação adipogênica, coloração com Oil Red; (D) Coloração pelo método de Von Kossa evidenciando área de mineralização em BMSCs induzidas à diferenciação osteogênica; (E) Matriz rica em proteoglicanos, após o processo de diferenciação condrogênica, coloração com Alcian Blue.

### 5.3 Avaliação da qualidade de descelularização do aloenxerto

O aloenxerto usado para execução do trabalho foi um terço distal de ulna direita de um doador com 40 anos, do sexo feminino, medindo 5,5 cm × 3,0 cm e pesando de 10 g (produto nº 10244, lote nº 306). Para avaliar a qualidade do processo de descelularização do aloenxerto, realizamos quantificação de DNA, histologia e MEV.

Através da quantificação por espectrofotometria, observou-se a baixa quantidade de DNA presente no aloenxerto, em média 23,25 ng ± 5 ng de DNA a cada 30 mg de tecido. E, a partir da análise histológica, não foram identificadas células viáveis ou osteócitos em lacunas (figura 16 A), enquanto na avaliação por MEV, observamos a preservação da microarquitetura do tecido (figura 16 B) e a ausência de células depositadas na superfície óssea (figura 16 C).



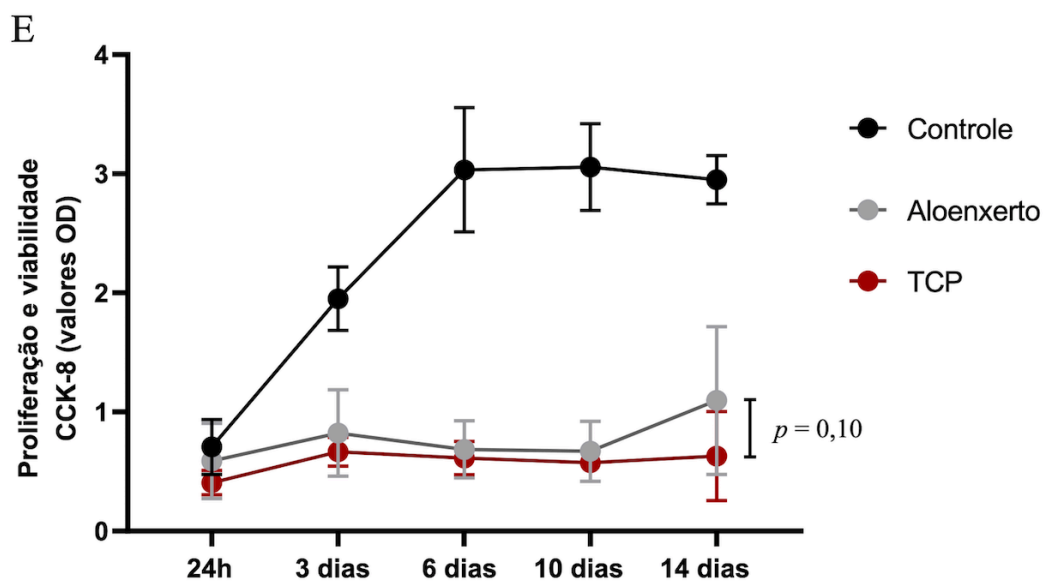
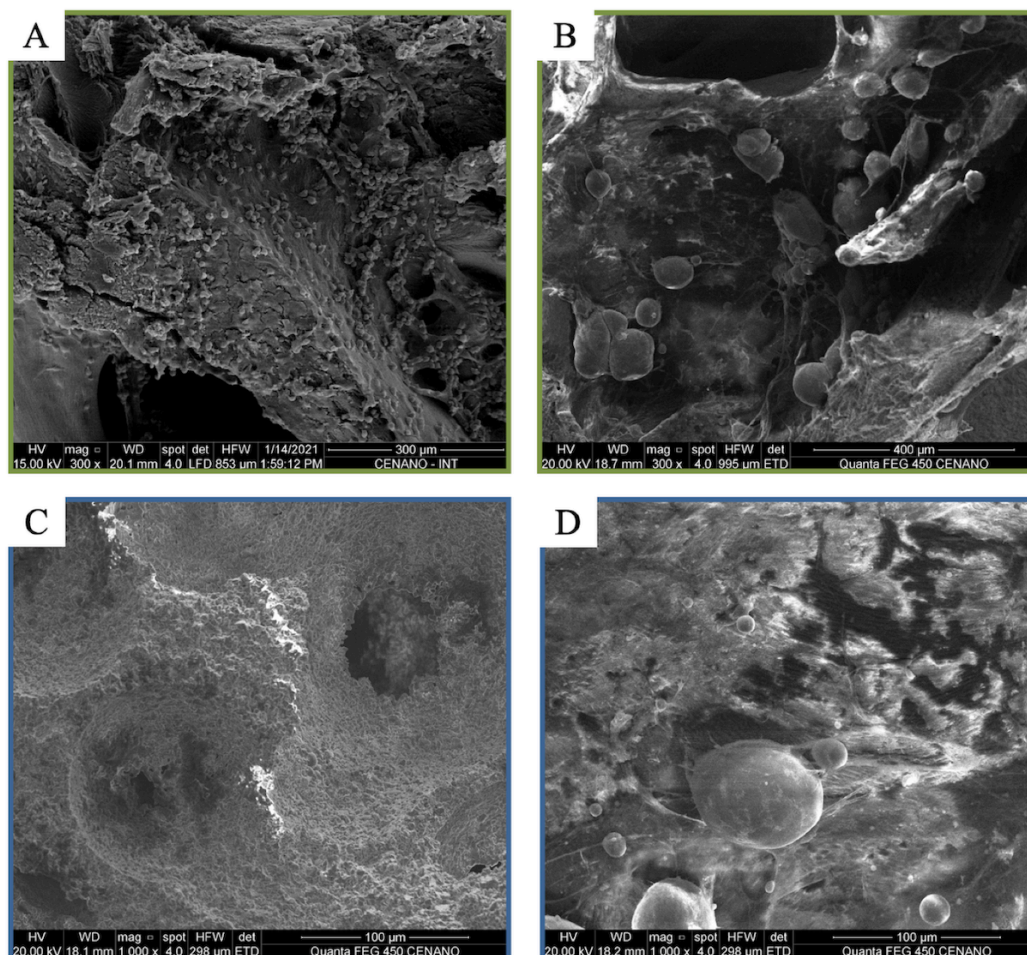
**Figura 16 - Avaliação da qualidade de descelularização do aloenxerto.** Imagens representativas do aloenxerto mostrando a eficiência do protocolo de descelularização. (A) Corte histológico do aloenxerto, setas demonstrando lacunas vazias, coloração H&E; aumento 20×. (B-C) Imagem da MEV do aloenxerto, ausência de células viáveis; aumento 130× (B), 200× (C).

#### 5.4 Avaliação da adesão e proliferação das BMSCs no aloenxerto

Após o processo de celularização, a adesão das BMSCs ao aloenxerto e ao  $\beta$ -TCP (controle) foi avaliada. As imagens de MEV revelaram que após duas horas, as BMSCs já estavam aderidas à superfície de ambos os materiais. Além disso, no 10º dia, observamos que as células permaneciam aderidas à matriz, ao passo que apresentavam uma morfologia mais alongada (figura 17 A-D).

Após adesão, avaliamos a capacidade de proliferação das BMSCs aderidas ao aloenxerto e ao  $\beta$ -TCP por 14 dias. Através do ensaio CCK-8, comparamos a curva de proliferação das BMSCs e notamos que diferente do controle (células aderidas somente ao plástico de cultivo celular) não houve crescimento exponencial da população aderida aos *scaffolds*. Em contraponto, observamos uma manutenção da viabilidade das BMSCs aderidas ao aloenxerto e ao  $\beta$ -TCP ao longo de 14 dias ( $p = 0,10$ ) (figura 17 E).

Em suma, esses resultados apontam que as BMSCs aderem à superfície do aloenxerto e permanecem viáveis por pelo menos 14 dias.

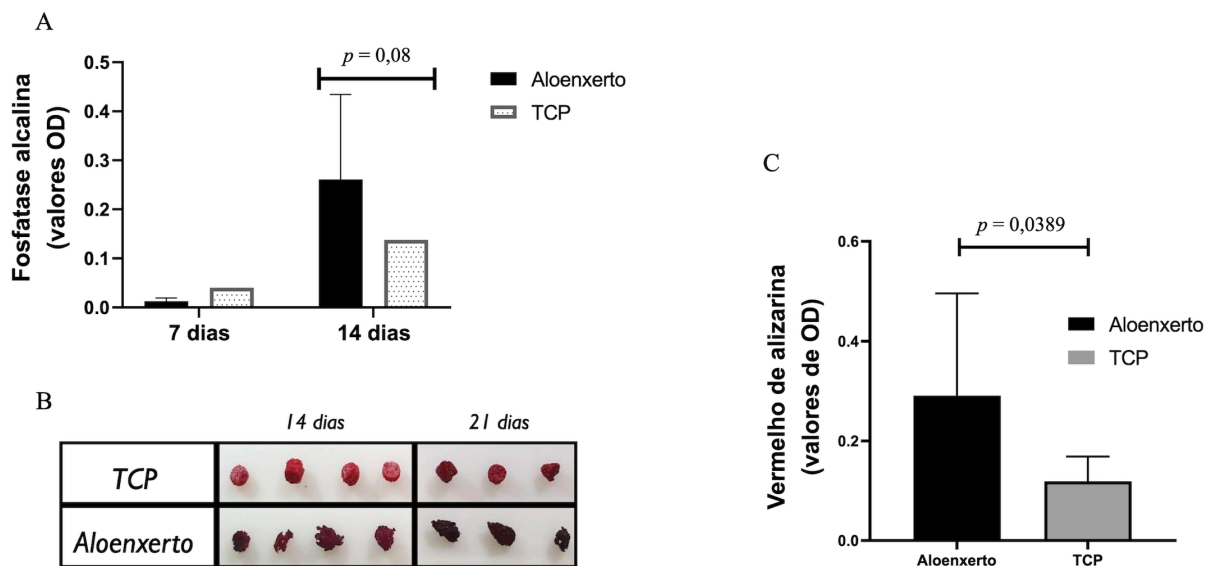


**Figura 17: Avaliação da adesão e proliferação das BMSCs no aloenxerto.** (A e B) Imagens da MEV mostrando as BMSCs aderidas ao aloenxerto; aumento 300×. (C e D) Imagens da MEV mostrando as BMSCs aderidas ao β-TCP; aumento 1000×. (E) Avaliação da proliferação e viabilidade celular através do ensaio de CCK-8. Teste ANOVA (2-way); (n = 4).

## 5.5 Avaliação *in vitro* do estímulo à diferenciação osteogênica

Com o objetivo de avaliar a capacidade do aloenxerto de induzir a diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio de quantificação da fosfatase alcalina, enzima responsável pela deposição de fosfato inorgânico e formação dos cristais de hidroxiapatita. No 7º dia após indução osteogênica, observou-se que as BMSCs, em ambos os grupos, não apresentaram atividade enzimática, em contraponto, no 14º dia, observou-se um pico da atividade da enzima no grupo do aloenxerto (figura 18 A). Ao comparar os dois grupos, observamos maior atividade enzimática nas células osteoinduzidas na presença do aloenxerto ( $p = 0,08$ ).

Em seguida, avaliamos a efetiva deposição de matriz osteogênica através da coloração com vermelho de alizarina. Ao comparar os grupos no período de 14 e 21 dias, observa-se uma mudança progressiva na tonalidade do vermelho, o que indica um aumento no grau de mineralização das BMSCs aderidas ao aloenxerto e  $\beta$ -TCP (figura 18 B). E, no 21º dia, observa-se uma maior mineralização nas culturas de BMSCs do grupo do aloenxerto ( $p = 0,03$ ) (figura 18 C). Por fim, esses resultados demonstram que o aloenxerto foi capaz de conduzir o processo de diferenciação osteogênico das BMSCs *in vitro*.



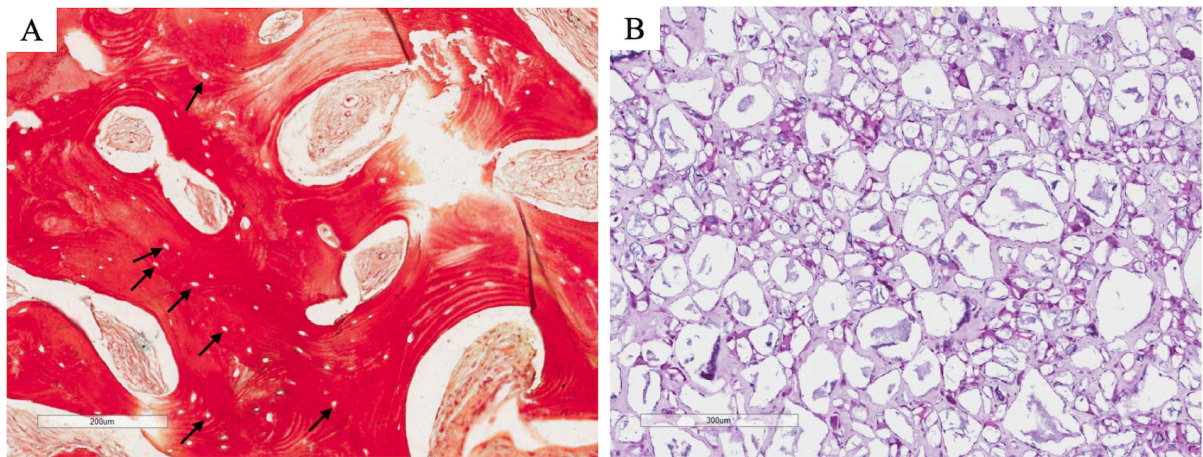
**Figura 18: Avaliação *in vitro* do estímulo à diferenciação osteogênica.** (A) quantificação da atividade de fosfatase alcalina nos grupos de BMSCs na presença do aloexerto e  $\beta$ -TCP ( $p = 0,08$  - Teste de Mann-Whitney). (B) Imagens macroscópicas dos aloexertos e  $\beta$ -TCs corados pelo vermelho de alizarina nos dias 14 e 21. (C) Quantificação do grau de mineralização no 21º dia ( $p = 0,039$  - Teste t de Welch). Gráficos representam média  $\pm$  desvio padrão; ( $n = 4$ ).

## 5.6 Avaliação *in vivo* do potencial osteogênico do aloexerto celularizado com BMSCs

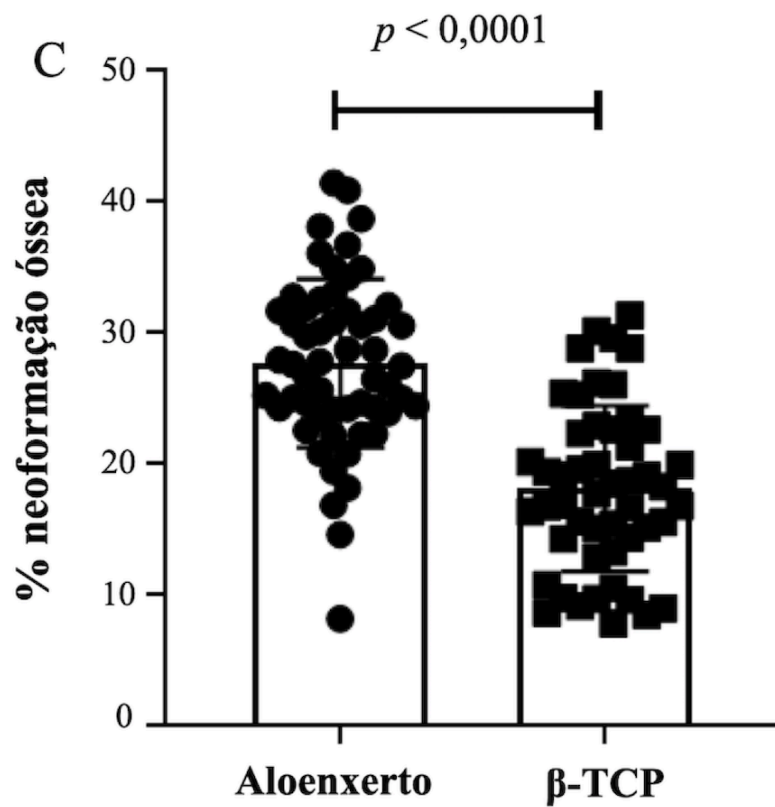
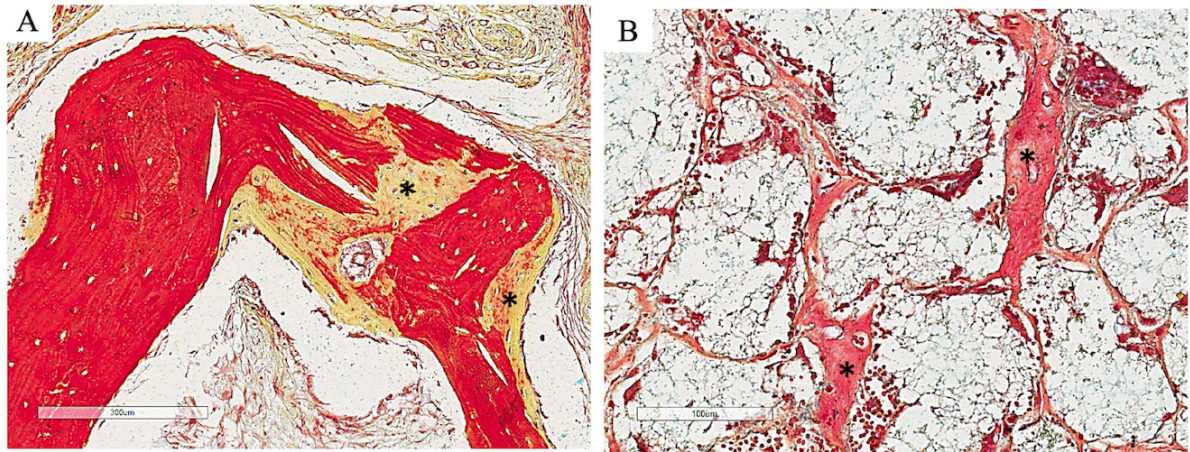
Doze semanas após a implantação dos construtos ( $ALO^{BMSC}$ ,  $TCP^{BMSC}$ ,  $ALO^0$  e  $TCP^0$ ) no subcutâneo de camundongos imunodeficientes, avaliamos a formação de tecido ósseo. No grupo  $ALO^{BMSC}$ , houve a formação de uma linha cimentante, que consiste na separação entre o aloexerto, onde é perceptível a presença de lamelas, orientadas pelas fibras de colágeno e ausência de células, e o osso novo, que consiste em uma região com aspecto amorfo, ou seja, sem uma organização definida das fibras e com osteócitos ainda em fase de maturação (figura 20 A). Além disso, a diferença histológica entre o osso neoformado no grupo  $ALO^{BMSC}$  fica mais evidente quando comparamos a estrutura tecidual do grupo  $ALO^0$  (figura 19 A), no qual só é possível observar a presença de osso velho e descelularizado. Ainda, comparando o grupo  $TCP^0$  (figura 19 B) com o grupo  $TCP^{BMSC}$  (figura 20 B), observa-se exclusivamente neoformações ósseas em torno dos grânulos de cristal e osteócitos em lacunas apenas no grupo  $TCP^{BMSC}$ .



Por fim, quando avaliada quantitativamente, um maior percentual de neoformação óssea foi observado no grupo ALO<sup>BMSC</sup> (27,62% ± 6,42%) em comparação aos implantes de TCP<sup>BMSC</sup> (18,11% ± 6,30%) (figura 20 C). Por fim, todos esses dados confirmam o potencial do aloenxerto de induzir a formação óssea *in vivo*, ao passo que ainda demonstram melhores resultados que os biomateriais sintéticos.



**Figura 19: Avaliação histológica dos implantes não celularizados.** Após 12 semanas no subcutâneo dos camundongos, os implantes foram coletados e avaliados por histologia. (A) Amostra do grupo ALO<sup>0</sup>, as setas sinalizam as lacunas vazias, em vermelho a estrutura do aloenxerto; coloração tricrômio de Goldner. (B) Amostra do grupo TCP<sup>0</sup>, não sendo identificada formações ósseas, coloração H&E. Aumento de 20×.



**Figura 20: Quantificação da neoformação óssea por histomorfometria.** Imagens histológicas das amostras. (A) Amostra do grupo ALO<sup>BMSC</sup>, (\*) asterisco identificando a área de formação de osso heterotópico, em vermelho: aloenxerto, em amarelo/laranja: a neoformação óssea; coloração tricrômio de Goldner. (B) Amostra do grupo TCP<sup>BMSC</sup>, (\*) asterisco identificando a área de neoformação óssea; coloração H&E. (C) Gráfico apresentando o resultado da análise histomorfométrica ( $p > 0,0001$ ; teste de Mann-Whitney); (n = 3).

## 6 DISCUSSÃO

---

Graças ao seu papel imunomodulador e de diferenciação osteogênica, as BMSCs têm sido testadas em uma variedade de ensaios clínicos (DASH et al., 2009; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; HARE et al, 2009; LE BLANC et al, 2004; PAL et al., 2009; WOODS; GRATZER, 2005). Apesar de todos os avanços que observamos na bioengenharia ortopédica, a incidência de fraturas, pseudoartrose e reabsorção de aloenxerto ainda são grandes preocupações. Sendo assim, novas opções de tratamento precisam ser propostas para melhorar a consolidação de fraturas. Nesse contexto, trabalhos anteriores mostraram que aloenxertos semeados com células da medula óssea parecem acelerar a cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico em ratos (KANDAL et al., 2016). No entanto, no aspecto humano pouco se sabe sobre as vantagens da associação de BMSCs com aloenxertos e se realmente fornecem uma opção para o tratamento de defeitos ósseos.

Os protocolos para isolamento e expansão das BMSCs empregados neste estudo foram baseados no conhecimento prévio do nosso grupo (DIAS et al, 2019; DIAS; BONFIM, 2021), assim como nas experiências de grupos internacionais (SABATINO et al., 2012; ROBEY et al., 2015). Sobre a expansão *in vitro*, algumas metodologias empregam de 3 passagens até a expansão ilimitada (KOÇ et al., 2000, 2002; HORWITZ et al., 2002; LE BLANC et al., 2004; LE BLANC; RINGDEN, 2007). Estudos que submeteram suas amostras celulares ao processo de expansão por 3 passagens (BLANCO et al., 2019; KIM et al., 2009; BERBÉRI et al., 2017), 4 passagens (LI QI et al., 2021; PERSSON et al., 2018) e 5 passagens (ZHANG et al., 2021) mantiveram a expressão dos marcadores de superfície e a morfologia fibroblástoide dessas células. No entanto, sabe-se que o cultivo prolongado das BMSCs retarda a proliferação, leva à senescência (WAGNER et al., 2008; KSIAŻEK, 2009) e à perda de multipotencialidade (BANFI et al., 2000; MURAGLIA; CANCEDDA e QUARTO, 2000; JAMES et al., 2015; REN

et al., 2015). E, de fato, com o protocolo estabelecido por nosso grupo, as BMSCs expressaram homogeneamente os marcadores de superfície de células estromais como CD73, CD90, CD105 e CD146 e mantiveram sua capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, confirmando que geramos produtos celulares com manutenção das características fenotípicas e funcionais das BMSCs definidos pela ISCT.

O transplante de BMSCs associadas a biomateriais é uma das estratégias mais promissoras para reconstrução óssea, fornecendo um nicho para diferenciação das células osteoprogenitoras e orientação para neoformação óssea. Neste trabalho, focamos na avaliação do aloenxerto como um *scaffold* para as BMSCs pela facilidade de obtenção desse material e por suas semelhanças biológicas, estruturais e mecânicas com o autoenxerto (BONSIGNORE et al., 2013). No entanto, o material celular residual dentro do aloenxerto pode contribuir para problemas de compatibilidade e reações adversas do hospedeiro (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Portanto, a validação do processo de descelularização do aloenxerto torna-se um passo fundamental para garantia de um transplante seguro e eficaz (BADYLAK; GILBERT, 2008).

Nesse contexto, diversas metodologias podem ser empregadas com o intuito de avaliar a eficácia do processo de remoção celular do tecido, como a técnica de H&E, microscopia eletrônica de varredura, avaliação histológica do conteúdo nuclear e quantificação de material genético (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Nas lâminas coradas com H&E, os osteócitos presentes nas lacunas foram eliminados após o processamento do material. Este parâmetro é o mais utilizado por autores na literatura para indicar a desvitalização de um tecido (LEE et al., 2016; XU et al., 2017). Da mesma maneira, a marcação nuclear com DAPI e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) condizem com os resultados ilustrados em H&E e corroboram com a hipótese de sucesso na eliminação celular,

o que também é observado na literatura em testes realizados para avaliação da descelularização (GARDIN et al., 2015).

No que tange a quantificação de DNA, Smith e colaboradores (2015) demonstrou, que após efetuar lavagens sucessivas, conseguiu uma remoção total de 99,2% de DNA, resultando em um conteúdo final de 16,9 ng DNA / mg de aloenxerto (SMITH et al., 2015). Em seu estudo, Rasch e colaboradores (2019) testou dois protocolos distintos, conseguindo uma redução média de 99,8% de DNA, revelando um valor médio de 40,3 ng / mg de aloenxerto (RASCH et al., 2019). Nesses trabalhos e no nosso estudo, as concentrações de DNA do produto final foram inferiores aos 50 ng/mg de tecido, valor estabelecido pelo grupo de Crapo, Gilbert e Badylak em 2011, como parâmetro de avaliação da descelularização tecidual. Portanto, concluímos que o protocolo utilizado de descelularização dos aloenxertos demonstra eficácia na remoção de material residual do doador, o que poderia estar associado com menores reações imunogênicas.

Em um segundo momento, buscamos padronizar um método de celularização passível de ser utilizado em ensaios clínicos. Por isso, fazendo buscas na literatura, observamos taxas de 15% da população de BMSCs revestindo o aloenxerto (LONG et al., 2014) e de 45 a 50% das BMSCs aderidas a partículas do *scaffold* sintético, após uma hora de associação dos biomateriais com as células (VERONESI et al., 2014). De maneira semelhante, Mebarki e colaboradores (2017) observaram, após três horas de incubação, a proporção de BMSCs aderentes ao aloenxerto de 49%, enquanto que no  $\beta$ -TCP foi de 28%. Tendo em vista esses trabalhos e a viabilidade de aplicação do protocolo dentro do centro cirúrgico e num intervalo intraoperatório, estabelecemos um período de duas horas para associação das BMSC ao aloenxerto. Ademais, num modelo de avaliação de neoformação óssea *in vivo* conduzido por nosso grupo, utilizamos cerca de 30 mg de  $\beta$ -TCP com  $1,0 \times 10^6$  BMSCs e observamos uma taxa de formação óssea em 90% dos *scaffolds* (DIAS et al., 2019). Por isso, buscamos padronizar a celularização dos aloenxertos com a mesma dose celular e utilizar o  $\beta$ -TCP, o

biomaterial sintético mais usado na ortopedia, como controle e parâmetro de avaliação do potencial biológico do aloenxerto.

A adesão, viabilidade e proliferação celular são parâmetros iniciais importantes na avaliação da biocompatibilidade do *scaffold* com as BMSCs. Nos ensaios *in vitro*, buscamos analisar se o aloenxerto é efetivamente capaz de oferecer um microambiente adequado para manter as BMSCs viáveis, e estimular tanto a proliferação quanto a diferenciação destas células.

Inicialmente, realizamos a avaliação da eficiência da celularização através da MEV em dois momentos distintos, após duas horas de celularização e 14 dias, conforme utilizado em outros estudos (RASCH et al., 2019; HASHIMOTO et al., 2011). Ao comparar a morfologia das BMSCs aderidas a superfície externa do  $\beta$ -TCP e do aloenxerto, observamos que no  $\beta$ -TCP as células apresentavam uma morfologia arredondada, enquanto no aloenxerto foi observada a presença de células mais fusiformes com extensões citoplasmáticas, indicando sua adesão precoce e mais eficiente (RASCH et al., 2019; MEBARKI et al., 2017). De fato, a arquitetura esponjosa do aloenxerto parece induzir uma melhor adesão, enquanto o alto nível de poros fechados no  $\beta$ -TCP concentra as células na área de superfície externa e pode dificultar a infiltração celular (LEOTOT et al., 2013). Por fim, concluímos que ambos os *scaffolds* foram capazes de fornecer suporte estrutural para adesão das BMSCs.

Em seguida, avaliamos a viabilidade e proliferação celular na presença do aloenxerto a partir do teste CCK-8. Qi Hongfei e colaboradores (2016) e Lu Weiguang e colaboradores (2019) utilizaram o CCK-8 em seus experimentos *in vitro*, concluindo que as BMSCs aderiram e proliferaram na superfície dos *scaffolds*. Nossos estudos confirmaram estes dados, e observamos que as células se mantiveram viáveis e metabolicamente ativas ao longo dos experimentos.

Em continuidade, avaliamos a capacidade de diferenciação das BMSCs aderidas ao aloenxerto. Para isso, avaliamos a atividade da fosfatase alcalina, enzima responsável por converter o fosfato orgânico em inorgânico e primordial para deposição de matriz mineralizada (KUEHLFLUCK et al., 2015), e quantificamos a matriz depositada pelas células através do vermelho de alizarina (TANIKAKE et al., 2017). Em nosso estudo, as BMSCs apresentaram uma discreta atividade da fosfatase alcalina na primeira semana, havendo um incremento significativo na expressão desta enzima na semana seguinte. No entanto, uma maior atividade da fosfatase alcalina, embora que discreta, foi observada no grupo ALO<sup>BMSC</sup>, quando comparada com o grupo TCP<sup>BMSC</sup>. Nossos dados estão de acordo com as observações feitas por Mebarki e colaboradores (2017), que observaram um aumento da atividade osteogênica nas primeiras duas semanas, com um desempenho maior no grupo do aloenxerto, quando comparado com o grupo do  $\beta$ -TCP.

Por fim, confirmando o estímulo osteogênico das BMSCs associadas ao aloenxerto realizamos a quantificação da deposição de matriz mineralizada. O vermelho de alizarina forma um complexo quelato com o cálcio depositado e, assim, pode ser usado como um indicador quantificável do potencial de mineralização óssea (WANG et al., 2019). Neste ensaio, o grupo ALO<sup>BMSC</sup> apresentou mais efetiva deposição de matriz mineralizada extracelular do que o grupo de células associadas ao  $\beta$ -TCP. Por fim, comprovamos nestes ensaios *in vitro*, que o aloenxerto é capaz de fornecer o suporte para adesão, sobrevivência e diferenciação das BMSCs.

Embora os ensaios *in vitro* sejam frequentemente usados para avaliação da osteogênese, o transplante *in vivo* é o “padrão ouro” para avaliar a diferenciação osteogênica (ROBEY; RIMINUCCI, 2020), visto que são considerados mais representativos da realidade encontrada no organismo, tentando mimetizar a complexidade do microambiente nas situações

clínicas de interesse (CHENG et al., 2021). No presente estudo, o ensaio *in vivo* avaliou o potencial osteogênico do aloenxerto celularizado com BMSCs, verificando que estas células expandidas *in vitro* realmente mantinham a capacidade de se diferenciar e formar osso, como observamos nos ensaios *in vitro*. E, de maneira quantitativa, observamos que a neoformação óssea induzida pelo aloenxerto foi maior do que no grupo com  $\beta$ -TCP. Nossos dados estão de acordo com estudos que demonstraram em ensaios *in vivo* que os aloenxertos celularizados com progenitores mesenquimais promoveram a diferenciação osteogênica e melhoram a neoformação óssea (CHENG et al., 2021; LONG et al., 2014).

Por fim, com achados superiores aos do grupo com  $\beta$ -TCP, nossos resultados fornecem informações importantes e evidências de que a associação do aloenxerto com BMSCs se apresentam como uma estratégia promissora para realização de ensaios clínicos no campo da bioengenharia óssea. No entanto, experimentos *in vivo*, que efetivamente avaliem a capacidade de estímulo à regeneração óssea desse constructo, precisam ser realizados a fim de garantir o sucesso biológico dessa associação de BMSCs com aloenxerto.



Concluimos neste estudo, que o método de coleta, isolamento, caracterização e expansão das BMSCs atenderam aos padrões internacionais e obedeceram a todos os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Certificamos que o protocolo de preparo do aloenxerto fornece um material descelularizado e confirmamos que o aloenxerto é capaz de fornecer suporte estrutural para adesão das BMSCs, oferecendo um microambiente favorável para sobrevivência e diferenciação dessas células e é capaz de induzir a neoformação óssea. Por fim, nossos resultados fornecem evidências de que a associação do aloenxerto com BMSCs se apresenta como promissora ferramenta para realização de ensaios clínicos no campo da regeneração óssea.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-AAL, A.M. Ilizarov bone transport for massive tibial bone defects. **Orthopedics**, v. 29, n. 1, p. 70-74, 2006.

AGATA, H.; WATANABE, N.; ISHII, Y.; KUBO, N.; OHSHIMA, S.; YAMAZAKI, M.; TOJO, A.; KAGAMI, H. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 2, p. 353-358, 2009.

AHLMANN, E.; PATZAKIS, M.; ROIDIS, N.; SHEPHERD, L.; HOLTOM, P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. **J Bone Joint Surg**, v. 84, n. 5, p. 716-720, 2002.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.

ALT, V. et al. A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo–Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. **Injury**, v. 40, n. 12, p. 1269-1275, 2009.

AMBROSI, T.H. et al. Distinct skeletal stem cell types orchestrate long bone skeletogenesis. **Elife**, v. 10, 2021.

ANDRZEJOWSKI, P.; GIANNOUDIS, P.V. The “diamond concept” for long bone non-union management. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019.

ARONSON, J.; JOHNSON, E.; HARP, J.H. Local bone transportation for treatment of intercalary defects by the Ilizarov technique: Biomechanical and clinical considerations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 243, p. 71-79, 1989.

ARONSON, J. Current concepts review: limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. **J Bone Joint Surg Am**, v. 79, n. 8, p. 1243-1258, 1997.

ARVIDSON, K. et al. Bone regeneration and stem cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 4, p. 718-746, 2011.

ATALA, A. Regenerative medicine strategies. **Journal of pediatric surgery**, v. 47, n. 1, p. 17-28, 2012.

AWAD, H.A.; BUTLER, D.L.; BOIVIN, G.P.; SMITH, F.N.; MALAVIYA, P.; HUIBREGTSE, B.; CAPLAN, A.I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue engineering**, v. 5, n. 3, p. 267-277, 1999.

AYUKAWA, Y.; SUZUKI, Y.; TSURU, K.; KOYANO, K.; ISHIKAWA, K. Histological comparison in rats between carbonate apatite fabricated from gypsum and sintered hydroxyapatite on bone remodeling. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

BACKSTEIN, D.; SAFIR, O.; GROSS, A. Management of bone loss: structural grafts in revision total knee arthroplasty. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 446, p. 104-112, 2006.

BADYLAK, S.F.; GILBERT, T.W. Immune response to biologic scaffold materials. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2008. p. 109-116.

BAHNEY, C.S. et al. Cellular biology of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 37, n. 1, p. 35-50, 2019.

BALDWIN, P. et al. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 33, n. 4, p. 203-213, 2019.

BANFI, A. et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental hematology**, v. 28, n. 6, p. 707-715, 2000.

BANKOWSKI, Z. et al. Biomedical research involving animals: proposed international guiding principles, proceedings of the XVIIth CIOMS Round Table Conference, Geneva, Switzerland, 8-9 December, 1983. 1984.

BERBÉRI, A. et al. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 5, p. 1599-1609, 2017.

BERNARDO, M.E.; ZAFFARONI, N.; NOVARA, F.; COMETA, A.M.; AVANZINI, M.A.; MORETTA, A.; MONTAGNA, D.; MACCARIO, R.; VILLA, R.; DAIDONE, M.G.; ZUFFARDI, O.; LOCATELLI, F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. **Cancer research**, v. 67, n. 19, p. 9142-9149, 2007.

BEYTH, S.; SCHROEDER, J.; LIEBERGALL, M. Stem cells in bone diseases: current clinical practice. **British medical bulletin**, v. 99, n. 1, p. 199-210, 2011.

BHATT, R.A.; ROZENTAL, T.D. Bone graft substitutes. **Hand clinics**, v. 28, n. 4, p. 457-468, 2012.

BIANCO, P. Back to the future: moving beyond “mesenchymal stem cells”. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 7, p. 1713-1721, 2011.

BIANCO, P.; CAO, X.; FRENETTE, P.S.; MAO, J.J.; ROBESY, P.G.; SIMMONS, P.J.; WANG, C.Y. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. **Nature Medicine**, v. 19, n. 1, p. 35-42, 2013.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; MARTIN, T.J. Principles of bone biology. Amsterdam and London: Elsevier, 3rd edition, 2008.

BLANCO, J.F. et al. Autologous mesenchymal stromal cells embedded in tricalcium phosphate for posterolateral spinal fusion: results of a prospective phase I/II clinical trial with long-term follow-up. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2019.

BLOKHUIS, T.J.; ARTS, J.J.C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. **Injury**, v. 42, p. S26-S29, 2011.

BOHNER, M.; SANTONI, B.L.G.; DÖBELIN, N.  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. **Acta biomaterialia**, v. 113, p. 23-41, 2020.

BONEWALD, L.F. The amazing osteocyte. **Journal of bone and mineral research**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2011.

BONSIGNORE, L.A. et al. Adherent lipopolysaccharide inhibits the osseointegration of orthopedic implants by impairing osteoblast differentiation. **Bone**, v. 52, n. 1, p. 93-101, 2013.

BORGSTRÖM, F. et al. Fragility fractures in Europe: burden, management and opportunities. **Archives of osteoporosis**, v. 15, n. 1, p. 1-21, 2020.

BOSKEY, A.L. Mineralization of bones and teeth. **Elements**, v. 3, n. 6, p. 385-391, 2007.

BOSKEY, A.L.; ROBEY, P.G. The composition of bone. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**, p. 49-58, 2013.

BOSSE, M.J. et al. An analysis of outcomes of reconstruction or amputation after leg-threatening injuries. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 24, p. 1924-1931, 2002.

BRASIL. Lei nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**, 2008.

BRAZILL, J.M. et al. Nerves in bone: evolving concepts in pain and anabolism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 8, p. 1393-1406, 2019.

BRINK, O. The choice between allograft or demineralized bone matrix is not unambiguous in trauma surgery. **Injury**, v. 52, p. S23-S28, 2021.

BUCHER, C.H. et al. Experience in the adaptive immunity impacts bone homeostasis, remodeling, and healing. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 797, 2019.

BUZA, J.A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 101-105, 2016.

CALORI, G.M. et al. Non-unions. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 186, 2017.

CAMPANA, V.; MILANO, G.; PAGANO, E.; BARBA, M.; CICIONE, C.; SALONNA, G.; LATTANZI, W.; LOGROSCINO, G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 10, p. 2445-2461, 2014.

CHAN, C.K.F. et al. Identification of the human skeletal stem cell. **Cell**, v. 175, n. 1, p. 43-56. e21, 2018.

CHARBORD, P.; TAVIAN, M.; HUMEAU, L.; PEAULT, B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. **Blood**, v. 87, p. 4109-4119, 1996.

CHATTERJEA, A.; MEIJER, G.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Clinical application of human mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. **Stem cells international**, v. 2010, p. 1-12, 2010.

CHENG, Lu et al. Enamel matrix derivative (EMD) enhances the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 7033-7045, 2021.

CHITWOOD, J.R. et al. Predicting fracture healing with blood biomarkers: the potential to assess patient risk of fracture nonunion. **Biomarkers**, v. 26, n. 8, p. 703-717, 2021.

CLAES, L.; ECKERT-HÜBNER, K.; AUGAT, P. The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 388, n. 5, p. 316-322, 2003.

CLAES, L.E.; CUNNINGHAM, J.L. Monitoring the mechanical properties of healing bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 467, n. 8, p. 1964-1971, 2009.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 133-143, 2012.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, p. S131-S139, 2008.

COX, G.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P.V. Reamer-irrigator-aspirator indications and clinical results: a systematic review. **International orthopaedics**, v. 35, n. 7, p. 951-956, 2011.

CRAPO, P.M.; GILBERT, T.W.; BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

DASH, N.R. et al. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Rejuvenation research**, v. 12, n. 5, p. 359-366, 2009.

DE LONG, W.G.JR.; EINHORN, T.A.; KOVAL, K.; MCKEE, M.; SMITH, W.; SANDERS, R.; WATSON, T. Bone grafts and bone graft substitutes in Orthopaedics Trauma Surgery, a critical analysis. **Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 89, n. 3, p. 649-658, 2007.

DIAS, R.B.; GUIMARÃES, J.A.; CURY, M.B.; ROCHA, L.R.; DA COSTA, E.S.; NOGUEIRA, L.P.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; FORTUNA-COSTA, A.; SILVA, A.K.F.; CUNHA, K.S.; DE SOUZA, S.A.L.; DUARTE, M.E.L.; SARTORE, R.C.; BONFIM, D.C. The manufacture of GMP-grade bone marrow stromal cells with validated in vivo bone-forming potential in an orthopedic clinical center in Brazil. **Stem cells international**, v. 2019, 2019.

DIAS, R.B.; BONFIM, D.C. The Isolation and Manufacture of GMP-Grade Bone Marrow Stromal Cells from Bone Specimens. In: **Stem Cells and Good Manufacturing Practices**. Humana, New York, NY, 2021. p. 95-105.

DINOPOULOS, H.T.H.; GIANNOUDIS, P.V. Safety and efficacy of use of demineralised bone matrix in orthopaedic and trauma surgery. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 5, n. 6, p. 847-866, 2006.

DOMINICI, M.L.B.K.; 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. 315-317, 2006.

DRINNON, K.D. et al. Sternal tumor resection and reconstruction using iliac crest autograft. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 8, n. 8, 2020.

DUDA, G.N. et al. The decisive early phase of bone regeneration. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1-18, 2023.

DUMIC-CULE, I.; PECINA, M.; JELIC, M.; JANKOLIJA, M.; POPEK, I.; GRGUREVIC, L.; VUKICEVIC, S. Biological aspects of segmental bone defects management. **International orthopaedics**, v. 39, n. 5, p. 1005-1011, 2015.

EGAN, K.P.; BRENNAN, T.A.; PIGNOLO, R.J. Bone histomorphometry using free and commonly available software. **Histopathology**, v. 61, n. 6, p. 1168-1173, 2012.

EHNERT, S. et al. Effects of immune cells on mesenchymal stem cells during fracture healing. **World Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 11, p. 1667, 2021.

EINHORN, T.A. The science of fracture healing. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 19, n. 10 Suppl., p. S4-S6, 2005.

EINHORN, T.A.; GERSTENFELD, L.C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 2015.

EL HADDAD, N. Mesenchymal stem cells: immunology and therapeutic benefits. In: **Stem Cells in Clinic and Research**, IntechOpen, 2011.

EL-JAWHARI, J.J.; JONES, E.; GIANNOUDIS, P.V. The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. **Injury**, v. 47, n. 11, p. 2399-2406, 2016.

EL-ROSASY, M.A. Acute shortening and re-lengthening in the management of bone and soft-tissue loss in complicated fractures of the tibia. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 89, n. 1, p. 80-88, 2007.

FALDINI, C. et al. Use of homologous bone graft in the treatment of aseptic forearm nonunion. **Musculoskeletal surgery**, v. 95, n. 1, p. 31-35, 2011.

FANG, W.H.; VANGSNESS JR, C.T. Food and Drug Administration's Position on Commonly Injected Biologic Materials in Orthopaedic Surgery. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 12, p. 3414-3421, 2021.

FAYAZ, H.C. et al. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. **International orthopaedics**, v. 35, n. 11, p. 1587-1597, 2011.

FELLAH, B.H.; GAUTHIER, O.; WEISS, P.; CHAPPARD, D.; LAYROLLE, P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials**, v. 29, n. 9, p. 1177-1188, 2008.

FERNANDEZ-YAGUE, M.A.; ABBAH, S.A.; MCNAMARA, L.; ZEUGOLIS, D.I.; PANDIT, A.; BIGGS, M.J. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 84, p. 1-29, 2015.

FEUVRIER, D.; SAGAWA JR, Y.; BÉLIARD, S.; PAUCHOT, J.; DECAVEL, P. Long-term donor-site morbidity after vascularized free fibula flap harvesting: clinical and gait analysis. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 2, p. 262-269, 2016.

FILIPOWSKA, J.; TOMASZEWSKI, K.A.; NIEDŹWIEDZKI, Ł.; WALOCHA, J.A.; NIEDŹWIEDZKI, T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. **Angiogenesis**, v. 20, n. 3, p. 291-302, 2017.

FILLINGHAM, Y.; JACOBS, J. Bone grafts and their substitutes. **The bone & joint journal**, v. 98, n. 1 (Suppl. A), p. 6-9, 2016.

FINKEMEIER, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84, n. 3, p. 454-464, 2002.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G.R.D.S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M.J.; CERRI, P.S. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

FRANCE, J.C.; SCHUSTER, J.M.; MORAN, K.; DETTORI, J.R. Iliac crest bone graft in lumbar fusion: the effectiveness and safety compared with local bone graft, and graft site morbidity comparing a single-incision midline approach with a two-incision traditional approach. **Global spine journal**, v. 5, n. 3, p. 195-206, 2015.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Development**, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet** 3: 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; LATSINIK, N.V.; PANASYUK, A.F.; KEILISS-BOROK, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974.

FROHLICH, K.L.; POTVIN, L. Transcending the known in public health practice: the inequality paradox: the population approach and vulnerable populations. **American journal of public health**, v. 98, n. 2, p. 216-221, 2008.

FRUTOS, A.G. et al. Randomized clinical trial: expanded autologous bone marrow mesenchymal cells combined with allogeneic bone tissue, compared with autologous iliac crest graft in lumbar fusion surgery. **The Spine Journal**, v. 20, n. 12, p. 1899-1910, 2020.

GARCÍA-BERNAL, D. et al. The current status of mesenchymal stromal cells: controversies, unresolved issues and some promising solutions to improve their therapeutic efficacy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 650-664, 2021.

GARCÍA-GARETA, E.; COATHUP, M.J.; BLUNN, G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, v. 81, p. 112-121, 2015.

GARDIN, C. et al. Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132344, 2015.

GELALIS, I.D. et al. Diagnostic and treatment modalities in nonunions of the femoral shaft. A review. **Injury**, v. 43, n. 7, p. 980-988, 2012.

GERSTENFELD, L.C. et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF- $\alpha$  signaling: The role of TNF- $\alpha$  in endochondral cartilage resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 9, p. 1584-1592, 2003.

GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 (Suppl.), n. 3, p. S20-S27, 2005.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury**, v. 38 (Suppl. 4), p. S3-S6, 2007.

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. **Injury**, v. 40 (Suppl. 3), p. S1-S3, 2009.

GIANNOUDIS, P.V.; FAOUR, O.; GOFF, T.; KANAKARIS, N.; DIMITRIOU, R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 591-598, 2011.

GIANNOUDIS, P.V.; KARADIMAS, E.J.; KANAKARIS, N.K. Anterior iliac crest bone graft harvesting. **Practical Procedures in Orthopedic Surgery: Joint Aspiration/Injection, Bone Graft Harvesting and Lower Limb Amputations**, p. 51-55, 2012.

GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

GINEBRA, Maria-Pau et al. Bioceramics and bone healing. **EFORT open reviews**, v. 3, n. 5, p. 173-183, 2018.

GIORI, N.J.; BEAUPRE, G.S. Femoral fracture after harvesting of autologous bone graft using a reamer / irrigator / aspirator. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 25, n. 2, p. e12-e14, 2011.

GIOTAKIS, N.; NARAYAN, B.; NAYAGAM, S. Distraction osteogenesis and nonunion of the docking site: is there an ideal treatment option? **Injury**, v. 38 (Suppl. 1), p. S100-S107, 2007.

GÓMEZ-BARRENA, E.; ROSSET, P.; GEBHARD, F.; HERNIGOU, P.; BALDINI, N.; ROUARD, H.; SENSEBÉ, L.; GONZALO-DAGANZO, R.M.; GIORDANO, R.; PADILLA-EGUILUZ, N.; GARCÍA-REY, E.; CORDERO-AMPUERO, J.; RUBIO-SUÁREZ, J.C.; STANOVICI, J.; EHRNTHALLER, C.; HUBER-LANG, M.; FLOUZAT-LACHANIETTE, C.H.; CHEVALLIER, N.; DONATI, D.M.; CIAPETTI, G.; FLEURY, S.; FERNANDEZ, M.N.; CABRERA, J.R.; AVENDAÑO-SOLÁ, C.; MONTEMURRO, T.; PANAITESCU, C.; VERONESI, E.; ROJEWSKI, M.T.; LOTFI, R.; DOMINICI, M.; SCHREZENMEIER, H.; LAYROLLE, P. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. **Biomaterials**, v. 196, p. 100-108, 2019.

GONG, T. et al. Nanomaterials and bone regeneration. **Bone research**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

GREGORY, C.A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.

HAK, D.J. et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. **Injury**, v. 45, p. S3-S7, 2014.

HARE, J.M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 24, p. 2277-2286, 2009.

HASHIMOTO, Y. et al. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7060-7067, 2011.

HERNIGOU, P.H.; POIGNARD, A.; BEAUJEAN, F.; ROUARD, H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: influence of the number and concentration of progenitor cells. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 7, p. 1430-1437, 2005.

HERTEN, M.; ZILKENS, C.; THOREY, F.; TASSEMEIER, T.; LENSING-HÖHN, S.; FISCHER, J.C.; SAGER, M.; KRAUSPE, R.; JÄGER, M. Biomechanical Stability and Osteogenesis in a Tibial Bone Defect Treated by Autologous Ovine Cord Blood Cells – A Pilot Study. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 295, 2019.

HINSENKAMP, M. et al. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. **International orthopaedics**, v. 36, n. 3, p. 633-641, 2012.

HOLZWARTH, K. et al. Multiplexed fluorescence microscopy reveals heterogeneity among stromal cells in mouse bone marrow sections. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 9, p. 876-888, 2018.



HORNICEK, F.J.; GEBHARDT, M.C.; TOMFORD, W.W.; SORGER, J.I.; ZAVATTA, M.; MENZNER, J.P.; MANKIN, H.J. Factors affecting nonunion of the host-allograft junction. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 382, p. 87-98, 2001.

HORWITZ, E.M. et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 13, p. 8932-8937, 2002.

HOUDEK, M.T.; BAYNE, C.O.; BISHOP, A.T.; SHIN, A.Y. The outcome and complications of vascularised fibular grafts. **The bone & joint journal**, v. 99, n. 1, p. 134-138, 2017.

IAQUINTA, M.R.; MAZZONI, E.; MANFRINI, M.; D'AGOSTINO, A.; TREVISIOL, L.; NOCINI, R.; TROMBELLI, L.; BARBANTI-BRODANO, G.; MARTINI, F.; TOGNON, M. Innovative biomaterials for bone regrowth. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 618, 2019.

ILIZAROV, G.A.; LEDYAEV, V.I. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 280, p. 7-10, 1992.

IVORY, J.P.; THOMAS, I.H. Audit of a bone bank. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 75, n. 3, p. 355-357, 1993.

JAMES, S. et al. Multiparameter analysis of human bone marrow stromal cells identifies distinct immunomodulatory and differentiation-competent subtypes. **Stem cell reports**, v. 4, n. 6, p. 1004-1015, 2015.

JIA, S. et al. In vivo evaluation of a novel oriented scaffold-BMSC construct for enhancing full-thickness articular cartilage repair in a rabbit model. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145667, 2015.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell proliferation**, v. 53, n. 1, p. e12712, 2020.

KANDAL, S.; ÖZMEN, S.; UYGUR, S.; YAGCI, M.; KAYHAN, H.; ELMAS, C.; ARAÇ, M.; ÇELEBI, C. Effects of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix on cranial bone healing. **Annals of plastic surgery**, v. 77, n. 2, p. 249-254, 2016.

KAPINAS, K.; DELANY, A.M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 3, p. 1-11, 2011.

KHAN, S.N.; F.P. CAMMISA JR., F.P.; SANDHU, H.S.; DIWAN, A.D.; GIRARDI, F.P.; LANE, J.M. The biology of bone grafting. **JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 2005.

KILINC, A. et al. Comprehensive analysis of the volume of bone for grafting that can be harvested from iliac crest donor sites. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 8, p. 803-808, 2017.

KILLINGTON, K. et al. A systematic review of clinical studies investigating mesenchymal stem cells for fracture non-union and bone defects. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 4, p. 284-291, 2018.

KIM, S.J.; SHIN, Y.W.; YANG, K.H.; KIM, S.B.; YOO, M.J.; HAN, S.K.; IM, S.A.; WON, Y.D.; SUNG, Y.B.; JEON, T.S.; CHANG, C.H.; JANG, J.D.; LEE, S.B.; KIM, H.C.; LEE, S.Y. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron™) injection to treat fractures. **BMC Musculoskeletal disorders**, v. 10, n. 1, p. 20, 2009.

KINI, U.; NANDEESH, B.N. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: **Radionuclide and hybrid bone imaging**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 29-57.

KISSLING, S.; SEIDENSTUECKER, M.; PILZ, I.H.; SUEDKAMP, N.P.; MAYR, H.O.; BERNSTEIN, A. Sustained release of rhBMP-2 from microporous tricalciumphosphate using hydrogels as a carrier. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

KOÇ, O.N. et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. **Journal of clinical oncology**, v. 18, n. 2, p. 307-307, 2000.

KOÇ, O.N. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone marrow transplantation**, v. 30, n. 4, p. 215-222, 2002.

KREBSBACH, P.H.; KUZNETSOV, S.A.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 10, n. 2, p. 165-181, 1999.

KSIAŻEK, K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. **Rejuvenation research**, v. 12, n. 2, p. 105-116, 2009.

KUEHLFLUCK, P.; MOGHADDAM, A.; HELBIG, L.; CHILD, C.; WILDEMANN, B.; SCHMIDMAIER, G.; HTRG-Heidelberg Trauma Research Group. RIA fractions contain mesenchymal stroma cells with high osteogenic potency. **Injury**, v. 46 (Suppl. 8), p. S23-S32, 2015.

KUZNETSOV, S.A. et al. Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. **Stem cell research**, v. 2, n. 1, p. 83-94, 2009.

LAFAGE-PROUST, M.H.; ROCHE, B.; LANGER, M.; CLERET, D.; BOSSCHE, A.V.; OLIVIER, T.; VICO, L. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. **BoneKEy reports**, v. 4, p. 662, 2015.

LANGDAHL, B.; FERRARI, S.; DEMPSTER, D.W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 8, n. 6, p. 225-235, 2016.

LASCHKE, M.W.; STROHE, A.; SCHEUER, C.; EGLIN, D.; VERRIER, S.; ALINI, M.; MENGER, M.D. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1991-2001, 2009.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. **Scandinavian journal of immunology**, v. 60, n. 3, p. 307-315, 2004.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of internal medicine**, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

LEE, D.J. et al. Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. **Journal of tissue engineering**, v. 7, p. 2041731416680306, 2016.

LENZE, U.; POHLIG, F.; KNEBEL, C.; LENZE, F.; HARRASSER, N.; MÜHLHOFER, H.; TAEPFER, A.; RECHL, H.; VON EISENHART-ROTHER, R. Autologous fibula transplantation for reconstruction of bone defects. **Der Orthopäde**, v. 46, n. 8, p. 648-655, 2017.

- LEOTOT, J. et al. Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 5, p. 6630-6640, 2013.
- LI, J. et al. Different bone remodeling levels of trabecular and cortical bone in response to changes in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mice. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 4, p. 812-819, 2017.
- LI, QI et al. The tissue origin effect of extracellular vesicles on cartilage and bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 125, p. 253-266, 2021.
- LIEBERMAN, J.R.; FRIEDLAENDER, G.E. Chapter I. Bone Dynamics, Bone Regeneration and Repair, Springer, p. 1, 2005.
- LIU, D. et al. 3D printed PCL/SrHA scaffold for enhanced bone regeneration. **Chemical Engineering Journal**, v. 362, p. 269-279, 2019.
- LONG, T. et al. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. **Biomaterials**, v. 35, n. 9, p. 2752-2759, 2014.
- LU, WEIGUANG. et al. Mesenchymal progenitors derived from different locations in long bones display diverse characteristics. **Stem cells international**, v. 2019, 2019.
- LUCARELLI, E.; FINI, M.; BECCHERONI, A.; GIAVARESI, G.; DiBELLA, C.; ALDINI, N.N.; GUZZARDELLA, G.; MARTINI, L.; CENACCHI, A.; DiMAGGIO, N.; SANGIORGI, L.; FORNASARI, P.M.; MERCURI, M.; GIARDINO, R.; DONATI, D. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. **Clin Orthop Rel Res** 435: 62-68, 2005.
- LUKOMSKA, B.; STANASZEK, L.; ZUBA-SURMA, E.; LEGOSZ, P.; SARZYNSKA, S.; DRELA, K. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1-10, 2019.
- MADISON, R.D.; NOWOTARSKI, P.J. The Reamer-Irrigator-Aspirator in nonunion surgery. **Orthopedic Clinics**, v. 50, n. 3, p. 297-304, 2019.
- MAKLEY, J.T. The use of allografts to reconstruct intercalary defects of long bones. **Clin Orthop Rel Res** 197: 58-75, 1985.
- MALHAN, D. et al. An optimized approach to perform bone histomorphometry. **Frontiers in endocrinology**, p. 666, 2018.
- MANOLAGAS, S.C.; PARFITT, A. Michael. What old means to bone. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 6, p. 369-374, 2010.
- MARCACCI, M.; KON, E.; MOUKHACHEV, V.; LAVROUKOV, A.; KUTEPOV, S.; QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue engineering**, v. 13, n. 5, p. 947-955, 2007.
- MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.
- MASQUELET, A.C.; FITOUSSI, F.; BEGUE, T.; MULLER, G.P. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. **Annales de chirurgie plastique et esthetique**, v. 45, n. 3, p. 346-353, 2000.
- MASQUELET, A.C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 388, n. 5, p. 344-346, 2003.

MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **Orthopedic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 27-37, 2010.

MASQUELET, A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 31 (Suppl.), p. S36-S38, 2017.

MASQUELET, A.C.; KISHI, T.; BENKO, P.E. Very long-term results of post-traumatic bone defect reconstruction by the induced membrane technique. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 105, n. 1, p. 159-166, 2019.

MASQUELET, A.C.; KANAKARIS, N.K.; OBERT, L.; STAFFORD, P.; GIANNOUDIS, P.V. Bone repair using the masquelet technique. **J Bone Joint Surg Am**, v. 101, n. 11, p. 1024-1036, 2019.

MCALLISTER, D.R. et al. Allograft update: the current status of tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 12, p. 2148-2158, 2007.

MEBARKI, M. et al. Enhanced human bone marrow mesenchymal stromal cell adhesion on scaffolds promotes cell survival and bone formation. **Acta Biomaterialia**, v. 59, p. 94-107, 2017.

MÉNARD, C.; TARTE, K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2013.

MENDIBIL, U. et al. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, p. 5447, 2020.

MENDICINO, M. et al. Current state of US Food and Drug Administration regulation for cellular and gene therapy products: potential cures on the horizon. **Cytotherapy**, v. 21, n. 7, p. 699-724, 2019.

MINAMI, A.; KASASHIMA, T.; IWASAKI, N.; KATO, H.; KANEDA, K. Vascularised fibular grafts: an experience of 102 patients. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 82, n. 7, p. 1022-1025, 2000.

MIRON, R.J.; ZHANG, Y.F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. **Journal of dental research**, v. 91, n. 8, p. 736-744, 2012.

MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ journal of surgery**, v. 71, n. 6, p. 354-361, 2001.

MORRISON, S.J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I.L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annual review of cell developmental biology**, v. 11, n. 1, p. 35-71, 1995.

MOUTSATSOS, I.K.; TURGEMAN, G.; ZHOU, S.; KURKALLI, B.G.; PELLED, G.; TZUR, L.; KELLEY, P.; STUMM, N.; MI, S.; MÜLLER, R.; ZILBERMAN, Y.; GAZIT, D. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration, **Molecular Therapy**, v. 3, n. 4, p. 449-461, 2001.

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

MURPHY, C.M.; O'BRIEN, F.J.; LITTLE, D.G.; SCHINDELER, A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. **Eur Cell Mater**, v. 26, n. 4, p. 120-132, 2013.

NICHOLSON, J.A. et al. Monitoring of fracture healing. Update on current and future imaging modalities to predict union. **Injury**, v. 52, p. S29-S34, 2021.

ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MOSHIRI, A.; MAFFULLI, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 9, n. 1, p. 18, 2014.

OSTERHOFF, G.; MORGAN, E.F.; SHEFELBINE, S.J.; KARIM, L.; MCNAMARA, L.M.; AUGAT, P. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. **Injury**, v. 47, p. S11-S20, 2016.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells. **Journal of cell science**, v. 1988, n. Supplement\_10, p. 63-76, 1988.

OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp.**, v. 136, n. 29, p. 42-60, 1988.

PAL, R. et al. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 3, n. 3, p. 163-174, 2009.

PELISSIER, P.; MARTIN, D.; BAUDET, J.; LEPREUX, S.; MASQUELET, A.C. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. **British journal of plastic surgery**, v. 55, n. 7, p. 596-598, 2002.

PELISSIER, P.; MASQUELET, A.C.; BAREILLE, R.; PELISSIER, S.M.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. **Journal of orthopaedic research**, v. 22, n. 1, p. 73-79, 2004.

PEREZ, J.R. et al. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 6, p. 105, 2018.

PERSSON, M. et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

POLYZOIS, D.; PAPACHRISTOU, G.; KOTSIPOULOS, K.; PLESSAS, S. Treatment of tibial and femoral bone loss by distraction osteogenesis: experience in 28 infected and 14 clean cases. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 68, n. Suppl. 275, p. 84-88, 1997.

POUNTOS, I. et al. Fracture non-union: can biomarkers predict outcome? **Injury**, v. 44, n. 12, p. 1725-1732, 2013.

QI, HONGFEI et al. Bioactivity assessment of PLLA/PCL/HAP electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Life sciences**, v. 148, p. 139-144, 2016.

QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; KUTEPOV, S.M.; MUKHACHEV, V.; LAVROUKOV, A.; KON, E.; MARCACCI, M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 5, p. 385-386, 2001.

QUINTAVALLA, J.; UZIEL-FUSI, S.; YIN, J.; BOEHNLEIN, E.; PASTOR, G.; BLANCUZZI, V.; SINGH, H.N.; KRAUS, K.H.; O'BYRNE, E.; PELLAS, T.C. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 109-119, 2002.

RASCH, A. et al. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0218404, 2019.

REN, J. et al. Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment. **Cytotherapy**, v. 17, n. 7, p. 897-911, 2015.

REZNIKOV, N.; SHAHAR, R.; WEINER, S. Bone hierarchical structure in three dimensions. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 9, p. 3815-3826, 2014.

ROBERTS, T.T.; ROSENBAUM, A.J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. **Organogenesis**, v. 8, n. 4, p. 114-124, 2012.

ROBEY, P.G.; KUZNETSOV, S.A.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Bone marrow stromal cell assays: in vitro and in vivo. In: **Skeletal Development and Repair**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 279-293, 2014.

ROBEY, P.G.; KUZNETSOV, S.A.; REN, J.; KLEIN, H.G.; SABATINO, M.; STRONCEK, D.F. Generation of clinical grade human bone marrow stromal cells for use in bone regeneration. **Bone**, v. 70, p. 87-92, 2015.

ROBEY, P.G.; RIMINUCCI, M. Skeletal stem cells: Tissue-specific stem/progenitor cells of cartilage, bone, stroma, and marrow adipocytes. In: **Principles of Bone Biology**. Academic Press, 2020. p. 45-71.

ROCHA, L.R. et al. Bone intramedullary reaming grafts the fracture site with CD146+ skeletal progenitors and downmodulates the inflammatory environment. **Injury**, v. 48, p. S41-S49, 2017.

ROSSET, P.; DESCHASEAUX, F.; LAYROLLE, P. Cell therapy for bone repair. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 100, n. 1, p. S107-S112, 2014.

SABATINO, M. et al. The establishment of a bank of stored clinical bone marrow stromal cell products. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2012.

SAMSELL, B. et al. Preservation of allograft bone using a glycerol solution: a compilation of original preclinical research. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2019.

SCHMIDT, A.H. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? **Injury**, v. 52, p. S18-S22, 2021.

SCHMIDT-BLEEK, K. et al. Boon and bane of inflammation in bone tissue regeneration and its link with angiogenesis. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 4, p. 354-364, 2015.

SCHLICKWEI, C.W. et al. Current and future concepts for the treatment of impaired fracture healing. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, p. 5805, 2019.

SEEBACH, C. et al. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. **Cell transplantation**, v. 21, n. 8, p. 1667-1677, 2012.

SEN, M.K.; MICLAU, T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? **Injury**, v. 38, n. 1, p. S75-S80, 2007.

SEOL, Y.J.; PARK, J.Y.; JUNG, J.W.; JANG, J.; GIRDHARI, R.; KIM, S.W.; CHO, D.W. Improvement of bone regeneration capability of ceramic scaffolds by accelerated release of their calcium ions. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 21-22, p. 2840-2849, 2014.

SHAPIRO, J.A. Incidence and Prevalence of Musculoskeletal Disease. In: **Clinical Foundations of Musculoskeletal Medicine**. Springer, Cham, 2021. p. 3-9.

SIMPSON, A.H.R.W. The forgotten phase of fracture healing: the need to predict nonunion. **Bone & Joint Research**, v. 6, n. 10, p. 610-611, 2017.

SMITH, C.A. et al. The use of a novel bone allograft wash process to generate a biocompatible, mechanically stable and osteoinductive biological scaffold for use in bone tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 9, n. 5, p. 595-604, 2015.

SOHN, H.S.; OH, J.K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. **Biomaterials research**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2019.

SOUCACOS, P.N.; JOHNSON, E.O.; BABIS, G. An update on recent advances in bone regeneration. **Injury**, v. 39, p. S1-S4, 2008.

SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. **Cell transplantation**, v. 25, n. 5, p. 829-848, 2016.

ST JOHN, T.A.; VACCARO, A.R.; SAH, A.P.; SCHAEFER, M.; BERTA, S.C.; ALBERT, T.; HILIBRAND, A. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. **American journal of orthopedics**, v. 32, n. 1, p. 18-23, 2003.

STEWART, S.K. Fracture non-union: a review of clinical challenges and future research needs. **Malaysian orthopaedic journal**, v. 13, n. 2, p. 1, 2019.

STRONCEK, D.F. et al. Establishing a bone marrow stromal cell transplant program at the National Institutes of Health Clinical Center. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 3, p. 200-205, 2014.

STRONG, A.L.; NEUMEISTER, M.W.; LEVI, B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. **Clinics in plastic surgery**, v. 44, n. 3, p. 635-650, 2017.

SWORDER, B.J. et al. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 3, p. 297-306, 2015.

TANIKAKE, Y. et al. Calcium concentration in culture medium as a nondestructive and rapid marker of osteogenesis. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 6, p. 1067-1076, 2017.

TAVASSOLI, M.; CROSBY, W.H. Transplantation of marrow to extramedullary sites. **Science**, v. 161, n. 3836, p. 54-56, 1968.

TAYLOR, G.I.; MILLER, G.D.; HAM, F.J. The free vascularized bone graft: a clinical extension of microvascular techniques. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 55, n. 5, p. 533-544, 1975.

TORRE, M.L.; LUCARELLI, E.; GUIDI, S.; FERRARI, M.; ALESSANDRI, G.; DE GIROLAMO, L.; PESSINA, A.; FERRERO, I. Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. **Stem cells and development**, v. 24, n. 6, p. 677-685, 2015.

TROUNSON, A.; THAKAR, R.G.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 52, 2011.

VERONESI, E. et al. Transportation conditions for prompt use of ex vivo expanded and freshly harvested clinical-grade bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for bone regeneration. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 3, p. 239-251, 2014.

XU, K. et al. Efficient decellularization for tissue engineering of the tendon-bone interface with preservation of biomechanics. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171577, 2017.

WAGNER, W. et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. **PloS one**, v. 3, n. 5, p. e2213, 2008.

WALSH, W.R.; OLIVER, R.A.; CHRISTOU, C.; LOVRIC, V.; WALSH, E.R.; PRADO, G.R.; HAIDER, T. Critical size bone defect healing using collagen-calcium phosphate bone graft materials. **PLoS One**, v.12, n.1, p. e0168883, 2017.

WANG, Y.; HAN, Z.B.; SONG, Y.P.; HAN, Z.C. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. **Stem Cell International**, v. 19, n. 1, p. 299-307, 2012.

WANG, D.; ZHANG, H.; LIANG, J.; LI, X.; FENG, X.; WANG, H.; HUA, B.; LIU, B.; LU, L.; GILKESON, G.S.; SILVER, R.M.; CHEN, W.; SHI, S.; SUN, L. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 12, p. 2267-2277, 2013.

WANG, J. et al. Induced membrane technique in the treatment of infectious bone defect: A clinical analysis. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 105, n. 3, p. 535-539, 2019.

WANG, Y.; YI, H.; SONG, Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. **Stem cell research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

WANG, W.; YEUNG, K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioactive materials**, v. 2, n. 4, p. 224-247, 2017.

WAUGH, A.; GRANT, A. *Ross and Wilson anatomy & physiology in health and illness*. Churchill Livingstone, Elsevier Health Sciences, 12th edition, 2014.

WEI, F.C.; EL-GAMMAL, T.A.; LIN, C.H.; UENG, W.N. Free fibula osteoseptocutaneous graft for reconstruction of segmental femoral shaft defects. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 43, n. 5, p. 784-792, 1997.

WEILAND, A.J. Current concepts review: vascularized free bone transplant. **J Bone Joint Surg Am** 63: 166-169, 1981.

WINKLER, T. et al. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. **Bone & joint research**, v. 7, n. 3, p. 232-243, 2018.

WITTAUER, M. et al. Definition of long-bone nonunion: A scoping review of prospective clinical trials to evaluate current practice. **Injury**, v. 52, n. 11, p. 3200-3205, 2021.

WONG, T.M.; LAU, T.W.; LI, X.; FANG, C.; YEUNG, K.; LEUNG, F. Masquelet technique for treatment of posttraumatic bone defects. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

WOODS, T.; GRATZER, P.F. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7339-7349, 2005.

WU, Ai-Min et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Healthy Longevity**, v. 2, n. 9, p. e580-e592, 2021.

YAJIMA, H.; TAMAI, S. Twin-barrelled vascularized fibular grafting to the pelvis and lower extremity. **Clin Orthop Relat Res**, n. 303, p. 178-184, 1994.



ZAMORA-MUÑOZ, P.M.; ORELLANA-RETA, C. Treatment of the tibial bone defects by traumatic sequels with the Ilizarov method in children. **Acta Ortop Mex**, v. 21, n. 6, p. 318-322, 2007.

ZHANG, J. et al. Repair of critical-sized mandible defects in aged rat using hypoxia preconditioned BMSCs with up-regulation of Hif-1 $\alpha$ . **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 4, p. 449, 2018.

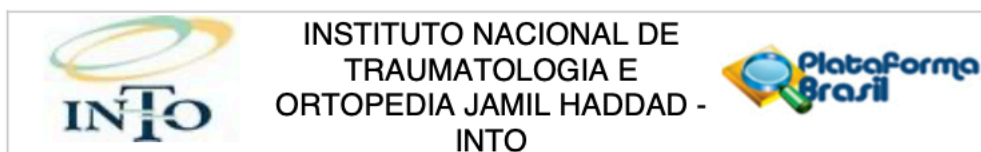
ZHANG, G. et al. BMSC seeding in different scaffold incorporation with hyperbaric oxygen treats seawater-immersed bony defect. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2021.

ZIGDON-GILADI, H.; RUDICH, U.; GELLER, G.M.; EVRON, A. Recent advances in bone regeneration using adult stem cells. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 3, p. 630-640, 2015.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42, p. S16-S21, 2011.

ZWINGENBERGER, S.; NICH, C.; VALLADARES, R.D.; YAO, Z.; STIEHLER, M.; GOODMAN, S.B. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. **BioDrugs**, v. 26, n. 4, p. 245-256, 2012.

## ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos

**Pesquisador:** Leonardo Rosa da Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 21778619.9.0000.5273

**Instituição Proponente:** Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA SAUDE

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.662.894

#### Apresentação do Projeto:

A extensa perda de tecido ósseo está associada a problemas como a não união ou ao atraso na regeneração. O sucesso na reconstrução dos defeitos ósseos depende das propriedades osteocondutoras e osteoindutivas do transplante autólogo. No entanto, o uso desses enxertos é limitado pela disponibilidade, morbidade e risco de infecção. Na busca de estratégias terapêuticas alternativas para a regeneração óssea, a pesquisa tem focado na associação de células osteoprogenitoras, "scaffold"/biomateriais e fatores de crescimento, uma abordagem conhecida como engenharia de tecidos. No entanto, a disponibilidade de scaffolds sintéticos de fácil manipulação, capazes de preencher o espaço e promover a proliferação e/ou diferenciação das células é um fator limitante.

#### Objetivo da Pesquisa:

Analisar o potencial de osteogênico dos implantes de aloenxertos associados com BMSCs.

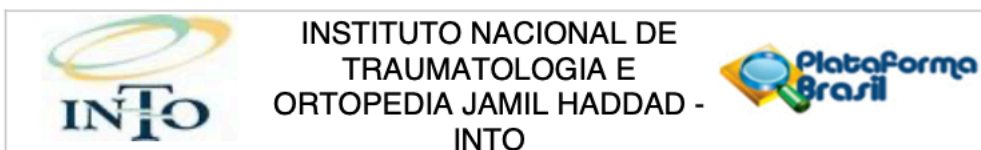
#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios se darão na medida que os achados encontrados em modelos animais possam ser transladados aos pacientes que necessitam de tratamento especializado.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Projeto é muito relevante para a comunidade científica e médica. Os resultados, dele esperado, trará fonte fecunda capaz de balizar novas ações no tratamento de perdas ósseas.

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500  
**Bairro:** São Cristóvão **CEP:** 20.940-070  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 3.662.894

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos e pareceres do CEUA estão de acordo com a legislação vigente.

**Recomendações:**

Acrescentar no TCLE quais serão as informações obtidas através da consulta ao prontuário.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendência

**Considerações Finais a critério do CEP:**

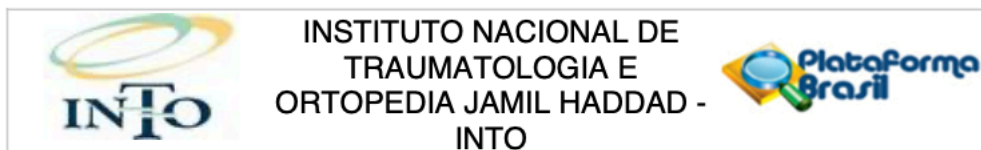
Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1432016.pdf	21/09/2019 12:34:43		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Cartaa.pdf	21/09/2019 12:29:58	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	21/09/2019 12:22:32	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	13/09/2019 09:49:57	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/09/2019 09:48:22	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Declaração do Patrocinador	201909091502589581.pdf	09/09/2019 15:56:10	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
Declaração de Pesquisadores	20190909150329956.pdf	09/09/2019 15:55:03	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500  
**Bairro:** São Cristóvão **CEP:** 20.940-070  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br



Continuação do Parecer: 3.662.894

Outros	ceua.JPG	09/09/2019 15:48:39	Leonardo Rosa da Rocha	Aceito
--------	----------	------------------------	---------------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Outubro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Marisa Peter Silva**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500  
**Bairro:** São Cristóvão **CEP:** 20.940-070  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

Página 03 de 03

## ANEXO B – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

---

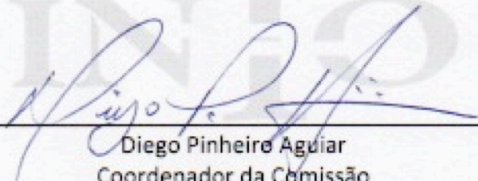


MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO

Certificamos que o projeto "Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos" protocolado sob o número 008/2019, utilizará 18 animais (dezoito) camundongos isogênicos B6.Cg-Foxn1<sup>tm1</sup>/J, sob a responsabilidade do pesquisador Leonardo Rosa da Rocha, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na reunião da Comissão em 10 de julho de 2019.

Rio de Janeiro, 08 de outubro de 2019.



Diego Pinheiro Aguiar  
Coordenador da Comissão  
CRbio 55130/02

## ANEXO C – APROVAÇÃO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA DO INTO

---



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPIEDIA JAMIL HADDAD

### DIVISÃO DE ENSINO E PESQUISA

#### CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Certificamos que o projeto intitulado “**USO DE CÉLULAS ESTROMAIS DA MEDULA ÓSSEA PARA CELULARIZAR ALOENXERTOS**”, REG.nº.029/2019, desenvolvido sob a responsabilidade de **LEONARDO ROSA DA ROCHA**, foi avaliado pela Comissão Científica do INTO na reunião do dia 07/08/2019 e está de acordo com as exigências estabelecidas pela instituição, tendo sido **APROVADO**.

O pesquisador está autorizado a submeter o projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/INTO, através da Plataforma Brasil.

A presente carta deverá ser anexada juntamente com os demais documentos à Plataforma Brasil.

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2019.

**Coordenação da Comissão Científica do INTO**

Avenida Brasil, nº 500, São Cristóvão, Rio de Janeiro – RJ  
Tel. (21) 2134-5000 Ramal: 5061.  
E-mail: [comissaocientificadointo@into.saude.gov.br](mailto:comissaocientificadointo@into.saude.gov.br)

## ANEXO D – TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR



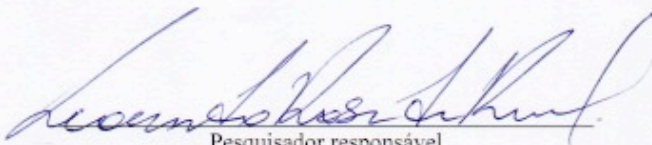
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu LEONARDO ROSA DA ROCHA, portado do CPF: 024.778.767.16,  
pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa de título "Uso de células estromais  
da medula óssea para celularizar aloenxertos",  
comprometo-me a anexar ao prontuário dos participantes de minha pesquisa, uma via do  
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em  
Pesquisa – CEP/INTO e devidamente consentido através da assinatura do participante,  
conforme disposto na Resolução CNS nº 466/12, que determina as normas regulamentadoras  
para realização de pesquisas envolvendo seres humanos.

Rio de Janeiro, 09 de Setembro de 2019  
Local e data

  
Pesquisador responsável

## ANEXO E – TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Eu, LEONARDO ROSA DA ROCHA, portador do CPF: 024.778.767.16, pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa de título "Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos"

que será realizado no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad - INTO/MS de forma retrospectiva, comprometo-me a manter o sigilo e o anonimato de todos os participantes incluídos neste estudo durante todas as apresentações científicas e publicações realizadas com estes dados conforme resolução CNS nº 466/12, que determina as normas regulamentadoras para realização de pesquisas envolvendo seres humanos.

Rio de Janeiro, 09 de Setembro de 2019.  
Local e data

Leonardo Rosa da Rocha  
Pesquisador responsável



## ANEXO F – MANUSCRITO SUBMETIDO A REVISTA “CELL AND TISSUE BANKING” EM 19 DE DEZEMBRO DE 2022

---

**De:** Cell and Tissue Banking (CATB) em@editorialmanager.com  
**Assunto:** CATB-D-22-00247 - Submission Notification to co-author - [EMID:3d07fa38dce8011]  
**Data:** 19 de dezembro de 2022 18:54  
**Para:** Leonardo Rosa da Rocha leonardorocha@me.com



---

Re: "Biological parameters for quality evaluation of allografts from the Brazilian National Institute of Traumatology and Orthopedics tissue bank"  
Full author list: Rafael Prinz; Leonardo Rosa da Rocha; Thiago Penna Eirado; Jonathan da Silva Pinto; João Antônio Matheus Guimarães; Fabricio Fogagnolo; Rhayra Braga Dias

Dear Mr da Rocha,

We have received the submission entitled: "Biological parameters for quality evaluation of allografts from the Brazilian National Institute of Traumatology and Orthopedics tissue bank" for possible publication in Cell and Tissue Banking, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Ms Rhayra Braga Dias who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Cell and Tissue Banking

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/catb/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

## ANEXO G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (1/3)



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*“Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos”*

*De acordo com as normas das Resoluções nº510 de 07/04/16, nº466 de 12/12/12 e nº441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde*

**Introdução:** Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos”. Você foi selecionado pelos critérios estabelecidos na RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Antes de decidir se você concorda ou não em participar deste estudo, você deve entender o que está envolvido e os potenciais riscos e benefícios. Este formulário traz informações detalhadas sobre o estudo que serão discutidas com você e pede a sua autorização para a coleta e uso de informações confidenciais a respeito de sua saúde que são necessárias para o estudo. Antes de decidir se toma parte ou não, leia as informações abaixo e peça ao seu médico mais informações sobre qualquer coisa que não tenha ficado clara. Depois de entender de que se trata o estudo, se você desejar participar, você será solicitado a assinar o formulário de consentimento. Reflita antes de tomar a decisão. Sua participação é inteiramente voluntária. Se você preferir não tomar parte neste estudo, você não será penalizado nem perderá nenhum benefício a que tenha direito. Espera-se que cerca de 10 pessoas participem deste estudo. O pesquisador principal deste estudo é o Dr. Leonardo Rosa da Rocha, médico ortopedista do Centro de Atenção Especializada do Trauma Ortopédico e Chefe da Área de Pesquisa (ARPES) do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO). Este estudo coletará dados e amostras de vários pacientes e ajudará a entender e melhorar o tratamento de defeitos ósseos. Você não terá qualquer tipo de custo/despesa por participar dessa pesquisa, como também não terá ressarcimento financeiro.

**Qual é o objetivo deste estudo?** O objetivo principal deste estudo é avaliar o potencial de formação óssea dos implantes formados pela associação de aloenxertos com células estromais da medula óssea.

**Como será feita esta pesquisa?** Para realização desta pesquisa, sua participação constará em ceder os descartes (“as sobras”) dos fragmentos ósseos gerados durante o seu tratamento cirúrgico que serão usados para obtenção das células estromais da medula óssea. Nós também precisaremos de algumas informações pessoais como sua data de nascimento, endereço, telefone e outras informações sobre doenças que você ou seus familiares tenham ou tiveram no passado.

**Quais serão as minhas responsabilidades se eu tomar parte deste estudo?** Se você for voluntário neste estudo, nós coletaremos do seu prontuário médico. A coleta será realizada pelo médico citado no início deste documento: Dr. Leonardo Rosa da Rocha. Essas informações serão arquivadas em um protocolo específico para este estudo.

**Quais são os possíveis riscos e desconfortos?** Não existe nenhum risco previsível envolvido no estudo, só há o tempo gasto para responder algumas perguntas quando da sua internação. Este estudo não mudará nem afetará de maneira nenhuma o seu tratamento. Você corre o risco de experimentar efeitos colaterais normalmente associados à cirurgia e anestesia, que já experimentaria normalmente, mesmo se não estivesse participando do estudo. Este risco será o mesmo, quer você tome parte neste estudo ou não, e o mesmo será discutido entre você, o seu ortopedista e o anestesista antes da cirurgia, independentemente deste estudo.

**Quais são os possíveis benefícios para você e/ou para a sociedade?** Nós não podemos lhe prometer nenhum benefício pessoal pela sua participação neste estudo. Entretanto, o resultado do estudo tem um impacto direto em melhores opções de tratamento para regeneração do tecido ósseo. Sua participação pode nos ajudar a desenvolver melhores opções e um tratamento mais seguro para a correção de defeitos ósseos e ajudar, no futuro, outros pacientes com defeitos ósseos. A sua condição não melhorará nem piorará durante este estudo.

**Se eu não quiser participar do estudo?** É importante que você saiba que você tem a liberdade de não participar do estudo. Se você não desejar participar, nós respeitaremos sua decisão e isso não afetará o seu tratamento.

Rubrica do responsável pela aplicação do termo:

Participante:

Folha 1 de 3

## ANEXO G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (2/3)



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*"Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos"*

*De acordo com as normas das Resoluções nº510 de 07/04/16, nº466 de 12/12/12 e nº441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde*

**Que responsabilidades tem o pesquisador sobre o seu tratamento?** Afirmamos que a pesquisa que estamos fazendo não tem qualquer tipo de influência ou interferência no seu tratamento. Nos consideramos responsáveis pelo seu tratamento e por qualquer intercorrência e/ou complicações que ocorra decorrente do tratamento realizado no Hospital.

**Que informações serão mantidas confidenciais?** Nós vamos remover dos seus dados todas as suas informações pessoais como o seu nome, endereço e número de telefone, e substituí-los por um código numérico. Nós manteremos uma lista conectando este número com o seu nome em um lugar seguro, separado do seu arquivo. Nós manteremos os seus dados – sem as suas informações pessoais – guardados com segurança em uma sala trancada no departamento de pesquisa. Nós garantimos que haverá todo o sigilo exigido nas normas brasileiras na utilização dos seus dados na pesquisa. Quando os resultados do estudo forem publicados ou apresentados em algum lugar, o seu nome não será utilizado e nenhuma informação que revele a sua identidade será liberada.

**Posso desistir de participar antes do final do estudo?** Como voluntário você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento. Isso não afetará de maneira alguma a qualidade do tratamento que você receberá nesta instituição. Você também poderá se recusar a responder qualquer questão do estudo sem ter que deixá-lo. O pesquisador poderá cancelar a sua participação no estudo se surgirem problemas que tornem isso necessário.

**Se eu tiver dúvidas ou problemas, a quem devo me dirigir?** Se você tiver qualquer dúvida a respeito da pesquisa, agora ou mais tarde, ou se você achar que sofreu algum problema relacionado com a pesquisa, contate o Dr. Leonardo Rosa da Rocha, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad – INTO, endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ – Brasil – CEP: 20940-070 - Telefone: (21) 2134-5000 / (21) 2134-5412. Se você tiver dúvidas relacionadas aos seus direitos como participante da pesquisa, ou quiser fazer uma reclamação ou denúncia relacionada aos aspectos éticos da pesquisa, você pode entrar em contato com o endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20940-070 - Telefone: (21) 2134-5000 / (21) 2134-5061- e-mail: [cep.into@into.saude.gov.br](mailto:cep.into@into.saude.gov.br)

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INTO é o órgão responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos realizadas no hospital, visando a salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar dos seus participantes. Esta pesquisa só pode ser iniciada depois de ter os seus procedimentos revisados e aprovados pelo CEP. Este termo foi redigido em três vias, você receberá uma via original deste documento, assinada pelo pesquisador responsável e por você, tendo todas as folhas rubricadas. Outra via para o pesquisador e uma para ser anexada ao seu prontuário.

- (i) Eu confirmo que li e entendi o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a Liberação de Dados, datado de ...../...../....., referente ao estudo descrito acima, e que tive a oportunidade de esclarecer minhas dúvidas.
- (ii) Eu entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que eu sou livre para desistir sem justificativa a qualquer momento, sem que meu tratamento médico ou meus direitos legais sejam afetados.
- (iii) Eu entendo que o responsável pelo estudo clínico, seus assistentes, o Comitê de Ética e as autoridades regulatórias poderão ter acesso aos meus registros médicos enquanto durar este estudo ou até que eu desista de participar do mesmo. Eu concordo com esse acesso. Entretanto, eu entendo que minha identidade não será revelada em nenhuma informação liberada a terceiros ou publicada.
- (v) Declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador responsável e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas e concordo em participar do estudo descrito acima.

Rubrica do responsável pela aplicação do termo:

Participante:

Folha 2 de 3

## ANEXO G – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (3/3)



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*“Uso de células estromais da medula óssea para celularizar aloenxertos”*

*De acordo com as normas das Resoluções nº510 de 07/04/16, nº466 de 12/12/12 e nº441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde*

### **Assinatura do participante na pesquisa ou de seu representante legalmente autorizado**

(Além de assinar abaixo, o participante da pesquisa ou o seu representante legalmente autorizado deverá rubricar todas as páginas deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

.....  
Assinatura (ou impressão digital) do paciente participante da pesquisa ou do seu representante legalmente autorizado.

Data ..... / ..... / .....

Nome do Signatário: .....

**Documento de consentimento administrado e explicado em pessoa por:** Dr. Leonardo Rosa da Rocha

**Assinatura do pesquisador responsável:** Segundo meu julgamento, o participante está voluntariamente e conscientemente dando consentimento livre e esclarecido e possui a capacidade legal de dar o consentimento livre e esclarecido para participar desta pesquisa. Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 510/2016, 466/2012 e 441/2011 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

(Além de assinar abaixo, o Pesquisador Responsável deverá rubricar todas as páginas deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

.....  
Assinatura do pesquisador responsável

Data ..... / ..... / .....

Nome do pesquisador responsável: Dr. Leonardo Rosa da Rocha



Tel.: 2134-5412 / e-mail: lrocha@into.saude.gov.br

Rubrica do responsável pela aplicação do termo:

Participante:

Folha 3 de 3

## ANEXO H. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DA ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS



	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD		BANCO MULTITECIDOS P-06	
<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	<i>PROCESSO</i>	<i>REVISÃO</i>		<i>FOLHA</i>
	Assistencial	Nº.	MÊS/ANO	1 / 14
		04	FEV/17	

<i>RESUMO DE REVISÕES</i>		
<i>MÊS/ANO</i>	<i>DESCRIÇÃO</i>	<i>PRÓX. REV.</i>
JUN/04	Emissão inicial	DEZ/04
JUN/05	Primeira revisão	JUN/08
OUT/08	Segunda revisão	OUT/11
MAI/12	Terceira revisão	MAI/15
FEV/17	Quarta revisão	FEV/18

### SUMÁRIO

- 1 OBJETIVO**
- 2 APLICAÇÃO**
- 3 REFERÊNCIAS**
- 4 DEFINIÇÕES E SIGLAS**
- 5 EXIGÊNCIAS**
- 6 RESPONSABILIDADES**
- 7 DESCRIÇÃO DA ROTINA**
- 8 ANEXOS**

<i>CONTROLE DE EMISSÃO</i>		
<i>ELABORADO/REVISADO POR</i>	<i>VERIFICADO POR</i>	<i>APROVADO POR</i>
VÍCTOR M. LIMA GUSTAVO BONFADINI WAGNER SANT'ÁNA ÉVLIN HONORATO MAIA	RAFAEL AUGUSTO D. PRINZ	CHRISTIANO C. DE FIGUEIREDO-INTO

	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD		BANCO MULTITECIDOS P-06	
			PROCESSO	REVISÃO
<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	Assistencial	Nº.	MÊS/ANO	2 / 14
		04	FEV/17	

## 1 OBJETIVO

Definir os procedimentos padronizados pelo BANCO MULTITECIDOS para o processamento de tecidos, visando garantir o controle de qualidade e segurança dos tecidos processados.



## 2 REFERÊNCIAS

- MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria Nº 2.600, de 21 de Outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.692/GM Em 23 de dezembro de 2004. Aprova e Define Banco de Tecidos Oculares, aprovando as Normas Gerais para sua Instalação e Cadastramento/Autorização.
- Banco de olhos, transplante de córnea/Hamilton Moreira, Luciene Barbosa de Souza, Élcio Hideo Sato – Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2008.
- Resolução de Diretoria Colegiada – RDC/ANVISA nº 67, de 30 de setembro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Oculares de origem humana.
- Resolução de Diretoria Colegiada – RDC/ANVISA nº 347, de 02 de dezembro de 2003. Determina Normas Técnicas para o Funcionamento de Bancos de Olhos.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 55, de 11 de dezembro de 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas em tecidos humanos para uso terapêutico.

## 3 EXIGÊNCIAS

- 3.1 Que o processamento seja realizado dentro do Banco de Tecidos do INTO, em ambiente apropriado, seguindo estritamente o conteúdo desta rotina.
- 3.2 Os processamentos deverão acontecer em Sala Limpa ISO 5 e/ou em Sala Limpa ISO 7 dentro de uma Cabine de Segurança Biológica Classe 2A (ISO 5).
- 3.3 A equipe para processamento de tecido musculoesquelético, deverá ser composta no mínimo por um responsável pelo processamento e 2 técnicos em processamento, sendo 1 como circulante interno ISO 7-corredor (para atendimento a todas as salas em processamento) e 1 como circulante interno ISO 5-sala limpa.
- 3.4 A equipe para processamento de tecido ocular deverá ser composta no mínimo por um responsável pelo processamento.
- 3.5 A equipe para processamento de pele deverá ser composta no mínimo por um responsável pelo processamento (processador) e um auxiliar em processamento como circulante de área limpa (ISO 7).

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD			<b>BANCO          MULTITECIDOS          P-06</b>	
	<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE          TECIDOS</b>	PROCESSO		REVISÃO	
Assistencial		Nº. 04	MÊS/ANO FEV/17	3 / 14	

#### 4 RESPONSABILIDADES

- 4.1 O responsável técnico ou seu substituto deve planejar o processamento semanal do tecido musculoesquelético.
- 4.2 O responsável pela atividade do processamento deverá analisar o prontuário do doador antes de processar o tecido, para verificação dos dados e possíveis contra-indicações para o processamento do mesmo.
- 4.3 É responsabilidade dos profissionais de enfermagem do setor arrumar todo o material para o processamento, tanto os estéreis como os não-estéreis. Cabe aos técnicos escalados para o dia do processamento checar a validade de todos os produtos que serão utilizados bem como a validade da esterilização.
- 4.4 É de responsabilidade do agente administrativo a emissão de etiquetas que serão utilizadas no processamento, assim como o registro no sistema dos produtos gerados após cada processamento de tecido musculoesquelético.
- 4.5 É responsabilidade da equipe de enfermagem do setor realizar antes do processamento a primeira avaliação macroscópica do globo ocular – caso o mesmo apresente alguma alteração, comunicar ao Responsável Técnico ou seu substituto, o qual irá decidir o destino do globo ocular (processamento, descarte, envio para o setor de anatomia patológica, pesquisa ou treinamento).
- 4.6 É responsabilidade da equipe de processamento processar o globo ocular o mais rápido possível após a captação. Caso não tenha equipe de processamento disponível, a equipe de captação deverá assumir esta tarefa após a sua chegada da captação.
- 4.7 O profissional da área da qualidade deverá reunir, conferir e organizar toda documentação e resultados de exames dos processamentos.
- 4.8 É de responsabilidade da equipe de limpeza realizar limpeza terminal, uma vez ao dia ou após cada processamento, das salas ISO 5 e ISO 7.



#### 5 DESCRIÇÃO DA ROTINA

As Salas limpas deverão ter sido submetidas à limpeza terminal antes do início do processamento, conforme descrito na Rotina BANCO MULTITECIDOS Q-03 (Rotina para Limpeza do Banco Multitecidos).

No dia do processamento nas salas ISO 5, por volta das 6hs, o funcionário da limpeza deverá passar álcool a 70% no piso, paredes e nas mesas auxiliares e ligar o fluxo laminar das salas.

Para os processamentos nas cabines de segurança biológica, antes de iniciar o processamento, um dos circulantes ou o processador deverá realizar a limpeza da área interna da cabine com álcool 70%, ligar a circulação de ar da cabine, aguardar o término e ligar a lâmpada UV da mesma pelo período de 15 minutos, para somente após se preparar para iniciar o procedimento. Ao terminar o processamento, o processador fica responsável pela retirada do material utilizado e realizar desinfecção da superfície interior da cabine de segurança biológica com compressa estéril embebida com álcool etílico a 70%.

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEdia JAMIL HADDAD		BANCO MULTITECIDOS P-06	
			PROCESSO	REVISÃO
<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	Assistencial	Nº.	MÊS/ANO	4 / 14
		04	FEV/17	

Após os processamentos e a retirada do material utilizado das salas ISO 5 ou ISO 7, deverá ser realizada a limpeza terminal, conforme descrito na Rotina BANCO MULTITECIDOS Q-03 (Rotina para Limpeza do Banco Multitecidos).

Todo o material utilizado no processamento e que entra em contato direto ou indireto com o tecido deverá estar estéril. A validade, a integridade do invólucro e a comprovação da esterilização (por mudança de cor do integrador externo e interno) deverão ser sempre checadas.

Todo o material deverá ser separado do estoque e arrumado, para posteriormente ser encaminhado à sala limpa. O material necessário ao processamento abrange os itens discriminados no Anexo 1.

Caso o processamento esteja programado para ser realizado em sala limpa ISO 5, após a limpeza terminal da área limpa, o fluxo laminar da respectiva sala deverá ser ligado. Trinta minutos depois, deverá ser feita a passagem do material cirúrgico e descartável para a área limpa ISO 7-corredor através do *pass-through* de entrada para área limpa (E), e todo material deverá ser transferido para a sala ISO 5 através do *pass-through* de entrada das salas (E1 e E2).

Caso esteja programado para ser realizado em uma das Cabines de Segurança Biológica da sala ISO 7, o material cirúrgico e descartável transferido para a área limpa ISO 7-corredor através do *pass-through* de entrada para área limpa (E), será transferido para a sala ISO 7 pelo *pass-through* de entrada da sala (E3).

## 5.1 Tecido Musculoesquelético

### 5.1.1 Distribuição e Responsabilidades da Equipe no Processamento

#### a) Atividades comuns aos circulantes internos ISO 7 e ISO 5:

- Providenciar o material necessário ao processamento do tecido musculoesquelético.

5.1.2 Separar do estoque todo o material para o processamento, dar baixa no mesmo, e encaminhá-lo da área de tecidos não liberados para a área ISO 7-corredor através do *pass-through* E, bem como encaminhar o tecido a ser processado.

5.1.3 Posteriormente, o circulante que ficar na área ISO 7 deverá entregar ao circulante interno ISO 5, através do *pass-through* E1 ou E2, o material necessário ao processamento e o tecido a ser processado.



5.1.4 A equipe que participará do processamento deverá encaminhar-se para a antecâmara, colocar a vestimenta de área limpa e iniciar a escovação das mãos. Depois de se paramentar (com luva cirúrgica estéril, capote cirúrgico estéril, touca, e tamanco estéril), o circulante interno classe ISO 5 arruma as mesas cirúrgicas e coloca as placas de petri (canto direito e canto esquerdo, mesa 1, mesa 2 e mesa 3) abertas nos locais correspondentes.

5.1.5 Ao terminar o processamento, os circulantes ISO 5 e ISO 7 deverão anotar as medidas e o peso das peças processadas e encaminhá-las ao freezer ou refrigerador de quarentena, registrando no impresso de controle correspondente ao freezer ou refrigerador, a prateleira na qual foi acondicionado o tecido processado.

5.1.6 Posteriormente, todo material coletado para exame microbiológico (frasco de hemocultura e placas de petri) deverá ser encaminhado ao laboratório do INTO, e os fragmentos que serão submetidos à análise histopatológica deverão ser encaminhados à anatomia patológica, ambos com devido registro no livro de protocolo do BANCO MULTITECIDOS.

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO



 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA	<b>BANCO          MULTITECIDOS          P-06</b>	
		<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE          TECIDOS</b>	<i>PROCESSO</i> Assistencial

a) Atividades específicas do circulante ISO 5:

- Em um primeiro momento, deverá trabalhar em condição asséptica, devendo realizar anti-sepsia e escovação. Após a escovação, deverá ser paramentado pelo circulante ISO 7 com capote e luvas estéreis. Durante a montagem da sala limpa e o processamento, o circulante interno ISO 5 deverá permanecer dentro da sala ISO 5, receber os materiais necessários ao processamento, pelo pass-through de entrada, e abri-los para o processador.
- Deverá arrumar a mesa 1 com recipientes estéreis (pré-lavagem, pós-lavagem, álcool e antibiótico), a mesa 2 (instrumental cirúrgico, motor e o torno), a mesa 3 (seladora e embalagens). A partir deste momento, passará a receber o tecido a ser processado do circulante ISO 7 e acondicioná-lo no recipiente destinado a pré-lavagem das peças. Deverá assessorar o processador nas diversas etapas do processamento (esqueletização, lavagem, desengorduramento, esterilização e selagem).
- Deverá também informar ao circulante ISO 7 todo material a ser encaminhado para análise laboratorial (cultura para fungos, aeróbios e anaeróbios das peças e dos líquidos pré-lavagem e pós-lavagem) e histopatológico.
- Após o processamento, deverá retirar todo o material cirúrgico utilizado no processamento da sala ISO 5 e encaminhá-lo à central de esterilização. As bombonas contendo os resíduos do processamento deverão ser fechadas e encaminhadas para o expurgo pelo funcionário do setor de limpeza.

b) Atividade específica do circulante ISO 7:

- Auxiliar a equipe do processamento a se paramentar.
- Passar todo o material necessário para o processamento através dos pass-through E1 ou E2.
- Identificar e registrar todas as peças processadas na Ficha de Processamento de Tecido Musculoesquelético (Anexo 2) e registrar todo o material utilizado no Relatório de Consumo de Processamento de Tecido Musculoesquelético (Anexo 3).
- Todo material estéril não utilizado no processamento deverá retornar ao estoque através do pass-through E.
- Registrar no livro de protocolo, identificar e encaminhar ao laboratório do INTO todo material para análise laboratorial, juntamente com a Solicitação de Exame Microbiológico preenchido (Rotina BANCO MULTITECIDOS P-07).
- Auxiliar o circulante ISO 5 a registrar o peso das peças processadas.



c) Processador

- O processador será o responsável pelo processamento do tecido musculoesquelético, devendo trabalhar em condições assépticas. Deverá entrar na área de antissepsia, realizar a escovação e devendo ser paramentado, pelo circulante ISO 7, com capote estéril.
- A entrada na sala de processamento ISO 5 deverá ser rápida, procurando deixar a porta aberta o mínimo possível. Ao término do processamento, o processador deverá assinar e carimbar a Ficha de Processamento de Tecido Musculoesquelético (Anexo 2).

**5.2 Material**

- **MESA 1 (Lavagem)**

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD			<b>BANCO          MULTITECIDOS          P-06</b>	
	<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE          TECIDOS</b>	PROCESSO		REVISÃO	
Assistencial		Nº.	MÊS/ANO	6 / 14	
		04	FEV/17		

– Oleado estéril	01
– Pote estéril com 1000ml de S.F. 0,9% (pré-lavagem)	01
– Pote estéril com etanol 70% 1L	01.
– Pote estéril com S.F.0,9% para pós-lavagem	01
– Pote estéril com antibiótico (11 frascos de vancomicina para 500ml de S.F.0,9% ou 22 frascos de vancomicina para 1000ml de S.F.0,9%).	01
– Kit de irrigação e aspiração estéril	01
– Seringas de 20ml	02
– Agulhas 40/12	04
▪ <b>MESA 2 (Esqueletização)</b>	
– Oleado estéril	01
– Conjunto de instrumental cirúrgico básico e específico para o processamento	01
– Motor à bateria	01
– Serras oscilatórias	02
– Torno	01
– Bisturis descartáveis 23	05
– Compressas cirúrgicas	várias
▪ <b>MESA 3 (Selagem)</b>	
– Oleado estéril	01
– Seladora estéril	01
– Embalagens triplas PP/P/M/G	várias



#### 5.2.1 Processamento

a) Inicialmente todas as peças ósseas serão banhadas em soro fisiológico 0,9% (banho 1) e três amostras deste lavado pré-processamento são colhidas. Duas amostras são inoculadas em tubos de hemocultura (cultura pré-processamento) para realização de cultura para anaeróbios e para aeróbios e uma amostra é armazenada em frasco estéril para pesquisa de fungos.

b) Procede-se então a etapa da esqueletização que é feita prendendo-se o tecido em um torno e retirando-se as partes moles com motor e ou instrumental adequado (mesa 2). Ao final desta etapa, será colhido um fragmento da peça para exame histopatológico, desde que o mesmo ainda preserve a qualidade do tecido (não deve ser destinado para histopatológico tecido macerado ou com quaisquer outras alterações que porventura dificultem a análise do mesmo). No caso do tecido tendinoso, é importante observar a seleção de área para análise histopatológica com cerca de 1cm de comprimento, de preferência mais próxima a junção mio-tendinosa, mas que não esteja preservada).

c) Posteriormente, as peças ósseas deverão ser banhadas em etanol 70% sob agitação por 10 minutos (banho 2). Isto é feito colocando-se a peça em pote estéril e submetendo-a à mesa agitadora na velocidade de 100 rpm. O circulante ISO 5 receberá o pote do processador e o posicionará na mesa agitadora, ajustará sua velocidade e marcará o tempo para agitação. Findo esse período, o circulante ISO 5 retirará o pote da mesa e abrirá para o processador retirar as peças. Caso não tenha no momento

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 INTA INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA	<b>BANCO          MULTITECIDOS          P-06</b>		
		<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE          TECIDOS</b>	PROCESSO Assistencial	REVISÃO Nº: 04      MÊS/ANO: FEV/17

a mesa agitadora disponível, fica o processador encarregado de realizar manualmente a agitação do recipiente aonde estiver o tecido.

d) As peças serão então transferidas para o banho 3, onde serão feitas várias lavagens com soro fisiológico, utilizando-se o kit de irrigação e aspiração estéril (retirada do líquido de lavagem por sucção a vácuo) por no mínimo 10 minutos (mesa 1). Após, três amostras deste lavado pós-processamento são colhidas. Duas amostras são inoculadas em tubos de hemocultura (cultura pós-processamento) para realização de cultura para anaeróbios e aeróbios e uma amostra é armazenada em frasco estéril para a pesquisa de fungos.

e) Após todo o procedimento acima, cada peça deverá ser imersa no banho 4 (vancomicina a 10mg/ml em soro fisiológico), sob agitação por 10 minutos (mesa 2). Um fragmento de cada peça deverá ser retirado e colocado em potes para posterior realização de testes de cultura.



f) Secar as peças geradas, proceder à mensuração dimensional (através da utilização de régua milimetrada) e pesagem asséptica das peças (através do apoio de cada peça em separado em bandeja estéril, apoiada sobre balança digital), e informar ao circulante ISO 5 os valores observados. Após, dispô-las em embalagens triplas na mesa 3, e proceder à selagem de cada peça de acordo com o padrão do Anexo 4, verificando o total fechamento da embalagem.

g) Para tendões e meniscos, o procedimento será apenas de preparação da forma para transplante, seguido de lavagem em solução fisiológica 0,9% (pós-lavado) e posterior antibiótico. Não será realizada a etapa de desengorduramento – etanol 70%. Todos os meniscos e tendões serão armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a não ser em situações especiais quando associados a tecidos osteocondrais, neste caso deverão ser armazenados em refrigerador.

h) No caso do tecido osteocondral, o mesmo deverá utilizar a solução a qual já está imerso advinda da captação como pré-lavado. O processamento do tecido deverá ser cuidadoso, a fim de se preservar toda a cartilagem, irrigando a mesma durante a esquelização com a solução da pré-lavagem, a fim de evitar o dano ao tecido osteocondral. Após toda a desperiostização, com manutenção no fragmento osteocondral somente do tecido ósseo e da cartilagem a ele associada, retirar pequeno fragmento osteocondral – 5mm - de área fora de utilização para o transplante (região de borda posterior do côndilo femoral ou área de sulco troclear no caso do processamento de côndilo femoral osteocondral), para histopatológico. Não será realizada a etapa de desengorduramento, devendo ao invés desta fase realizar a lavagem do tecido com soro fisiológico 0,9%, o qual irá compor o pós-lavado, com suas análises correspondentes. Também não deverá ser realizada a passagem do tecido em antibiótico, tendo em vista que o mesmo após a pós-lavagem será imerso em meio de preservação com antibiótico. Após a pós-lavagem, o tecido osteocondral deverá ser secado delicadamente com compressas; e deve-se a seguir, colher fragmento para cultura de área não viável para o transplante; mensurar e pesar o mesmo em bandeja estéril sob balança digital (neste momento deve-se realizar também a observação de todas as medidas relacionadas ao formulário de processamento de osteocondral, assim como ser assinaladas ao circulante ISO 5 possíveis imperfeições e/ou alterações do tecido osteocondral, para posterior preenchimento pelo processador em formulário próprio). A selagem em embalagens triplas deverá ter seu início com a colocação do tecido osteocondral na embalagem mais interna, e selagem parcial da mesma; a seguir, realiza-se a colocação do meio de preservação com antibiótico (através da utilização de funil ou equipamento similar), com fechamento definitivo então desta embalagem primária, e selagem das demais embalagens seguindo a rotina do tecido musculoesquelético em geral.

i) Após a identificação, as peças processadas deverão ser armazenadas no freezer de quarentena (no caso de peças ósseas e/ou tendões ou meniscos sem meio de preservação) ou no refrigerador de quarentena (no caso de tecido osteocondral e ou outro tecido mantido em meio de preservação), sendo retornadas pelo pass-through (E1 ou E2), para o corredor ISO 7, e deste para o pass-through de saída de quarentena (S).

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 <b>INTO</b> <small>INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA</small>	<b>BANCO MULTITECIDOS P-06</b>	
		<b>ROTIMA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	PROCESSO Assistencial

j) O material colhido durante o processamento deverá ser encaminhado para ao laboratório do INTO, para realização de exames microbiológicos (culturas das soluções e das placas de petri), e os fragmentos que serão submetidos à análise histopatológica deverão ser encaminhados à anatomia patológica.

k) As peças geradas deverão ser lançadas no programa informatizado do Banco de Tecidos pelo agente administrativo.

l) Cabe ao circulante interno ISO 7, ao final do processamento, anotar todo o material utilizado durante o mesmo no Relatório de Consumo do Processamento de Tecido Musculoesquelético (Anexo 3). Cabe também ao circulante ISO 7 o preenchimento adequado no Formulário de Processamento de Tecido Musculoesquelético: das descrições e medidas dos tipos de tecidos produzidos – seguindo nomenclatura padrão de descrição de tipos de produtos musculoesqueléticos, assim como de informações relacionadas a identificação do processamento, data, horários, temperatura e pressão da sala. Também cabe ao profissional a função de anexar na folha de processamento as etiquetas relacionadas a captação dos tecidos processados e ao meio de preservação utilizado (no caso do osteocondral).

m) Cabe ao processador, ao final do procedimento, preencher no formulário de processamento do tecido musculoesquelético as anotações relacionadas a ocorrências do processamento, assim como observações relacionadas ao tecido osteocondral e assinalar as etapas do processamento realizadas. Carimbar o formulário de processamento e demais pedidos de exames microbiológicos e de histopatológico.

n) Todo material colhido para exames microbiológicos deverão ser entregues com os pedidos devidamente preenchidos – Solicitação de Exames Microbiológicos e Histopatológico (BANCO MULTITECIDOS-P-07).

o) Após o processamento, todo instrumental utilizado e resíduos deverão ser retirados através do *pass-through* de saída para circulação de serviço e encaminhados para o DTRS 2. O material cirúrgico deverá ser encaminhado à central de esterilização e os resíduos deverão ser coletados por funcionário do setor de limpeza. Todo resíduo deverá sair da área limpa através do *pass-through* de saída da sala 1 e/ou 2 (S1/S2). Considerar o resíduo produzido no processamento como lixo biológico e, quando aplicável, proceder conforme Rotina BANCO MULTITECIDOS-Q-09 (Rotina de Gerenciamento de Resíduos do Banco de Tecidos).

p) Após o processamento, a sala limpa deverá ser submetida a uma limpeza terminal, conforme Rotina BANCO MULTITECIDOS-Q-03.

## 6 ANEXOS

Anexo 1 – Material para Processamento de Tecidos

Anexo 2 – Ficha de Processamento de Tecido Musculoesquelético

Anexo 3 – Relatório de Consumo de Processamento de Tecido Musculoesquelético

Anexo 4 – Forma de Selagem

Anexo 5 – Ficha de Processamento de Tecidos Oculares

Anexo 6 – Relatório de Consumo de Processamento de Tecido Ocular

Anexo 7 – Ficha de Processamento de Pele

Anexo 8 – Relatório de Consumo de Processamento de Pele

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO





ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS	PROCESSO	REVISÃO		FOLHA
	Assistencial	Nº.	MÊS/ANO	9 / 14
		04	FEV/17	

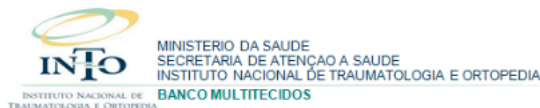
### Anexo 1 – Material para processamento de tecidos

#### A. Tecido Musculoesquelético

CAMPOS DESCARTÁVEIS	INSTRUMENTAL
04 agulhas 40 x 12 01 bico auto fluxo 07 bisturis descartáveis estéreis nº 23 01 caixa de luvas de procedimento 02 canetas de demarcação cirúrgica 03 capotes (avental cirúrgico) 01 irrigador com bateria 04 oleados (cobertura de mesa auxiliar) 06 pacotes de compressa estéreis 01 pacote de gaze estéril 06 pares de luva 7,0 06 pares de luva 7,5 06 pares de luva 8,0 04 pares de luva 8,5 04 seringas 20ml 02 seringas 60ml 08 transfix 01 vestimenta de sala limpa tamanho G 01 vestimenta de sala limpa tamanho GG	01 allogripp 01 bandeja INOX 01 caixa de processamento básica de doador cadáver 01 caixa de processamento específica de doador cadáver 01 caixa de processamento de doador vivo 01 caixa de raspas de Wagner 01 cesta INOX 01 container estéril 01 lâmina reciprocating estéril para motor 01 lâmina sagital estéril para motor 01 motor System 03 ou mais baterias para motor System 01 régua INOX 01 seladora 01 torno
MATERIAL DE ANTISSEPSIA	EMBALAGENS
01 almotolia de álcool a 70% 02 escovas de degemação individual 02 litros de etanol 70% estéril	embalagens plásticas triplas estéreis (depende da quantidade de produtos gerados)
DIVERSOS	IMPRESSOS
01 caixa coletora de material pérfuro cortante 01 caixa coletora de resíduos 06 frascos de 1000ml de soro fisiológico a 0,9% 01 funil 02 litros de vancomicina 500mg (diluído pela UFARM) 03 recipientes estéreis (potes plásticos ou vidro) 01 solução multienzimática 03 tamancos cirúrgicos estéreis	Ficha de Processamento de Tecidos Musculoesquelético Relatório de Consumo de Processamento Etiquetas das amostras de controle microbiológico Solicitação de Exame Microbiológico Solicitação de Histopatológico
MATERIAL DE LABORATÓRIO	
coletores estéreis para exames microbiológicos (depende da quantidade de peças processadas) 02 frascos de cultura para aeróbio 02 frascos de cultura para anaeróbio 05 placas de petri	

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA	<b>BANCO MULTITECIDOS</b> <b>P-06</b>	
		<b>ROTIMA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	PROCESSO Assistencial

**Anexo 2 – Ficha de Processamento de Tecidos Musculoesqueléticos (frente)**



FICHA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS MUSCULOESQUELETICOS	
<b>IDENTIFICAÇÃO DO DOADOR</b> D _____ LOTE: _____ COD. PROCESSAMENTO: _____ CONTROLE: _____ PEÇAS: _____ _____ _____ _____	DATA PROCESSAMENTO: _____ HORA DE INICIO DO FLUXO: _____ HORA INICIO: _____ (ENTRADA SALA ISO 5) HORA TERMINO: _____ (SAÍDA SALA ISO 5) SALA DO PROCESSAMENTO: _____ TEMPERATURA DA SALA: _____ PRESSÃO DIFERENCIAL DA SALA: _____

> Reprocessamento?  Sim  Não  
 Lote: \_\_\_\_\_ Produto: \_\_\_\_\_

> Tecidos processados:  
 OSSO       TENDÃO       OSTEOCONDAL

> Etapas:

1. Etapa de <u>Desengorduramento</u>	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA
Se sim, qual? Etanol a 70%			
2. Etapa de Profilaxia antimicrobiana	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA
Se sim, qual? Vancomicina			
3. Cultura para aeróbicos, anaeróbicos e fungos das peças ( <u>pré-lavado</u> )	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA
4. Cultura para aeróbicos, anaeróbicos e fungos das peças ( <u>pós-lavado</u> )	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA
5. Fragmento para histopatológico de cada peça	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA
6. Fragmento para cultura bacteriológica e de fungos	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NA

> Ocorrências:  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO



<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	PROCESSO	REVISÃO		FOLHA
	Assistencial	Nº.	MÊS/ANO	11 / 14
		04	FEV/17	

**Anexo 2 – Ficha de Processamento de Tecidos Musculoesqueléticos (verso)**

> Peças geradas:

	PEÇA	Nº PRODUTO	MEDIDAS	PESO
a)				g
b)				g
c)				g
d)				g
e)				g
f)				g
g)				g
h)				g
i)				g
j)				g
k)				g
l)				g
m)				g
n)				g
o)				g
			Peso total	g

> Equipe do processamento:



Processador: _____	Circulante do corredor: _____
Circulante da sala: _____	Circulante externo: _____

ETIQUETAS DAS PEÇAS


**X** \_\_\_\_\_  
Profissional Responsável

> Liberação/Inutilização dos produtos no sistema (assinar e datar):

\_\_\_\_\_

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA	<b>BANCO          MULTITECIDOS          P-06</b>	
		<b>ROTIMA DE PROCESSAMENTO DE          TECIDOS</b>	PROCESSO Assistencial

**Anexo 3 – Relatório de Consumo de Processamento de Tecido Musculoesquelético**  
**RELATÓRIO DE CONSUMO DE PROCESSAMENTO DE TECIDO MUSCULOESQUELÉTICO**

DC: _____	DATA DO PROCESSAMENTO: ____ / ____ / ____
PRONT.: _____	
NOME: _____	

Material	Fabricante	Lote	Validade	Quant separada	Quant utilizada	Total Utilizado
Agulha 12 x 40						
Almotolia de álcool 70%						
Bandeja inox						
Bico auto fluxo						
Bisturi descartável estéril nº. 23						
Caixa processamento básica						
Caixa processamento doador vivo						
Caixa processamento específica						
Caneta de demarcação cirúrgica estéril com régua						
Capote						
Cesta inox						
Coletor estéril						
Compressa estéril						
Container						
Cultura para Aeróbicos						
Cultura para Anaeróbicos						
Embalagem plástica tripla estéril						
Escova de degermação individual						
Etanol a 70% estéril (Data da diluição ____ / ____ / ____)						
Funil						
Gaze estéril						
Hallo gripp						

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO





MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA  
JAMIL HADDAD



BANCO  
MULTITECIDOS  
P-06



<b>ROTINA DE PROCESSAMENTO DE TECIDOS</b>	PROCESSO	REVISÃO		FOLHA
	Assistencial	Nº 04	MÊS/ANO FEV/17	13 / 14

Irrigador com bateria					
Lâmina estéril para motor sagital					
Lâmina estéril para motor reciprocating					
Luvas estéreis 7,5					
Luvas estéreis 8,0					
Luvas estéreis 8,5					
Luva de procedimento (pares)					
Motor Soutter					
Oleado (cobertura de mesa auxiliar)					
Placa de Petri					
Raspas de Wagner					
Recipiente vidro					
Recipiente plástico					
Régua inox					
Seladora					
Seringa 20 mL					
Seringa 60 mL					
Solução multienzimática					
Soro fisiológico 0,9% 1000ml					
Soro fisiológico 0,9% 500ml					
Transofix (extensor para transferência de soluções parenterais)					
Vancomicina diluída 500ml					
Vancomicina 500g					
Vestimenta de Sala Limpa					

Assinatura resp. pela separação

Assinatura resp. pelo preenchimento no processamento

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO – INTO

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD	 INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA	BANCO MULTITECIDOS P-06	
		PROCESSO Assistencial	REVISÃO Nº.      MÊS/ANO 04      FEV/17

#### Anexo 4 – Forma de Selagem



Obs.: Cada linha de selagem deve ser realizada com dupla selagem, para assegurar a total vedação da embalagem.