

**BETÂNIA SOUZA MONTEIRO**

**TRATAMENTO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE  
CAMUNDONGOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
ASSOCIADAS OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2009**

BETÂNIA SOUZA MONTEIRO

**TRATAMENTO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE  
CAMUNDONGOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS  
OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de junho de 2009.

---

Prof. Joaquin H. Patarroyo salcedo  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Marlene Isabel Vargas Vilorio  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Nance Beyer Nardi

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(Orientador)

*Dedico este trabalho:*

À DEUS por sempre iluminar meu caminho e conduzir-me por caminhos de paz, luz e felicidade.

À minha querida mãe por todo carinho, respeito e confiança que sempre teve por mim. Essa conquista é sinal do meu amor e de minha saudade. MÃE nunca morre, MÃE vira anjo!

Ao meu irmão Vinícius, sempre amigo, companheiro, incentivador e patrocinador de todos os meus sonhos.

Ao meu pai, que me ensinou a ser paciente e resignada diante das adversidades da vida.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do trabalho e por todos os anos de ensinamento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou meus estudos e dedicação.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo pela valiosa e competente orientação, paciência, disponibilidade, ensinamentos, conselhos, carinho e amizade. Sua competência, dedicação e serenidade tornaram-se referências para mim.

À Professora Nance Beyer Nardi, Dr. Pedro Chagastelle e Dra. Melissa Camassola da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que nos possibilitaram treinamentos em culturas celulares, parceria na pesquisa e amizade.

Aos Professores Marlene Isabel Vargas Vilorio e Joaquin Hérnan Patarroyo Salcedo por todos os conselhos durante a execução e a redação deste trabalho.

Aos Professores Antônio José Natali e Maria do Carmo Pelúzio que viabilizaram a permanência dos animais nos biotérios de produção e de experimentação.

Ao Professor Cláudio Mafra e ao estudante Higo Nasser Moreira do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pelo auxílio durante a execução dos exames moleculares.

Ao Professor Richard Filgueiras pela amizade, apóio e idéias para o trabalho.

Ao Professor Sérgio de Paula pela disponibilidade e orientações técnicas durante o processo de qualificação e defesa.

A todos os professores do Departamento de Veterinária da UFV pelos ensinamentos diários e comprometimento com o ensino de qualidade.

Ao amigo e companheiro de luta Napoleão Argôlo por todo apoio emocional e técnico que possibilitaram a realização deste projeto. Obrigada por todas as risadas, brigas e confusões que vivemos nesses longos anos de dedicação. Você é um vencedor e agora é o seu momento de se tornar grande e ganhar o mundo!

Aos irmãos que a vida me permitiu escolher, que mesmo de longe, estiveram presentes em todos os momentos: Bruno Santos, Lisandra Pinheiro, Paula Balbinot e Luisa Souza.

À Laila Bonfã por todo carinho, companheirismo e pela paciência frente as minhas ansiedades. Sua amizade tornou-se um suporte fundamental nessa etapa e, sua alegria e fé abreviaram os momentos de angústia e dúvidas. Obrigada pelo privilégio de sua convivência e por sua enorme bondade.

Ao Túlio, Milk e Primos pelas alegrias, confusões e por fazer de minha casa um lugar muito mais feliz!

À Cinthya Neves, Ana Flora Brito e Amanda Reis por estarem sempre dispostas a ajudar e pelo auxílio nas cirurgias.

À Lukiya Favarato, Evandro Favarato e Jair Duarte pelo companheirismo ao longo de todos os anos de pós-graduação e pela amizade que se consolidou.

À Bruna Devens e todos os colegas do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (BIOAGRO).

À Karina Silva, Cynthia Castro, Miguel Carneiro e todos os colegas do biotério de experimentação animal do Departamento de Educação Física.

Aos amigos da pós-graduação Kelly Pontes, Tatiana Duarte, Emily Carlo, Tatiana Borges, Waleska Dantas, João Paulo Machado, Liana Vilela, Maurício Daltro, Fabio Braga, Flávio Lopes, Renato Eleotério e tantos outros cuja memória trai-me em nomeá-los.

Aos amigos Pablo, Maria Fernanda (Kiki), Thaís e Laila pelos momentos de descontração, risadas, filmes, jantares e sabedorias compartilhadas.

Aos funcionários Rosinéia, Maria José, Etelvina, Adão, Claudiomiro, Paulo, Lucinda, Izabel, Sônia, Divina e Geraldinho por serem sempre prestativos.

Aos meus tios, tias e primos por todo incentivo e carinho.

Aos animais, agradeço com gratidão. São eles razão dos nossos estudos e motivação para o nosso trabalho.

Aos camundongos, que na doação da vida tornaram-me possível o título de “*Doutora em Medicina Veterinária*”.

## BIOGRAFIA

BETÂNIA SOUZA MONTEIRO, filha de Antônio de Souza Monteiro e Maria do Rosário de Souza Monteiro, nasceu em 03 de maio de 1979, em Ipatinga – MG.

Em março de 2003, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Em março de 2004 adquiriu o título de Especialista em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, nesta mesma instituição, onde em seguida iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, concentrando seus estudos na área de cirurgia de pequenos animais e obtendo o título de *Magister Scientiae* em agosto de 2005.

Em agosto de 2005, ingressou no programa de Doutorado em Medicina Veterinária no Departamento de Veterinária – UFV, submetendo-se a defesa de tese em junho de 2009.

Em março de 2009 iniciou trabalhos como docente, na disciplina de Técnica Cirúrgica Veterinária na Pontifícia Universidade Católica, Campus de Betim, MG.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
<b>1) Capítulo I. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual</b>	<b>1</b>
Introdução	2
Célula-tronco	3
Diferenciação das células-tronco adultas	3
Considerações	5
Referências	5
<b>2) Capítulo II. Células-tronco mesenquimais: uma breve revisão</b>	<b>7</b>
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Plasticidade das células-tronco mesenquimais (MSC)	11
Pericitos e MSC	12
Imunofenotipagem	13
Propriedades imunológicas	14
A função da MSC na reparação dos tecidos	16

Conclusões	18
Agradecimentos	19
Referências	19
<b>3) Capítulo III. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações</b>	<b>24</b>
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Células-tronco embrionárias	29
Células-tronco somáticas	31
Células-tronco pluripotentes induzidas	34
Considerações finais	35
Referências	35

<b>4) Capítulo IV. Tratamento de defeitos críticos produzidos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais</b>	40
Resumo	41
Abstract	42
Introdução	42
Material e Métodos	44
Animais em experimentação	44
Cultura de células-tronco mesenquimais	44
Expansão da cultura primária	44
Experimentação <i>in vivo</i>	45
Períodos de avaliação	46
Avaliação macroscópica	47
Análise estatística	47
Avaliação microscópica	47
Extração de DNA	47
Reação em cadeia da polimerase	48
Resultados	48
Discussão	55
Conclusão	59
Agradecimentos	60
Referências	60

<b>5) Capítulo V. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos</b>	<b>64</b>
Resumo	65
Abstract	65
Introdução	66
Material e Métodos	67
Animais em experimentação	67
Obtenção do plasma rico em plaquetas	67
Experimentação <i>in vivo</i>	68
Períodos de avaliação	69
Avaliação macroscópica	69
Análise estatística	70
Avaliação microscópica	70
Resultados	70
Discussão	77
Conclusão	81
Agradecimentos	81
Referências	81

<b>6) Capítulo VI. Associação de células-tronco mesenquimais com plasma rico em plaquetas na reparação de defeitos críticos em calvária de camundongos.</b>	<b>84</b>
Resumo	85
Abstract	86
Introdução	86
Material e Métodos	88
Animais em experimentação	88
Obtenção do plasma rico em plaquetas	88
Cultura de células-tronco mesenquimais	89
Expansão da cultura primária	89
Experimentação <i>in vivo</i>	90
Períodos de avaliação	91
Avaliação macroscópica	91
Análise estatística	92
Avaliação microscópica	92
Extração de DNA	92
Reação em cadeia da polimerase	92
Resultados	93
Discussão	100
Conclusão	105
Agradecimentos	106
Referências	106

## LISTA DE FIGURAS

<b>1 - Capítulo IV. Tratamento de defeitos críticos produzidos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais</b>		<b>Página</b>
Figura 1	Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório.	49
Figura 2	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle.	51
Figura 3	Fotomicrografia do aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle.	52
Figura 4	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação do defeito ósseo aos 10 dias em um animal do grupo MSC.	53
Figura 5	Fotomicrografias evidenciando o aspecto microscópico de uma região de formação de novo tecido ósseo em animais do grupo MSC. A) 60 dias. B) 90 dias.	54
Figura 6	Fotografia do gel de agarose exibindo o bandeamento das amostras submetidas a PCR.	55
<b>2 - Capítulo V. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos</b>		
Figura 1	Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório.	71
Figura 2	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle.	73
Figura 3	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle.	74
Figura 4	Fotomicrografia exibindo aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo PRP.	75
Figura 5	Fotomicrografia exibindo o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo PRP.	76
Figura 6	Fotomicrografia demonstrando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 90 dias por um animal do grupo PRP.	77

### **3 - Capítulo VI. Associação de células-tronco mesenquimais com plasma rico em plaquetas na reparação de defeitos críticos em calvária de camundongos**

Figura 1	Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório.	94
Figura 2	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle.	96
Figura 3	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle.	97
Figura 4	Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo MSC/PRP.	98
Figura 5	Fotomicrografia demonstrando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo MSC/PRP.	99
Figura 6	Fotografia do gel de agarose exibindo o bandeamento das amostras submetidas a PCR.	100

## LISTA DE TABELAS

<b>1 - Capítulo IV. Tratamento de defeitos críticos produzidos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais</b>	<b>Página</b>
Tabela 1- Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com MSC e os valores de $p$ calculados.	50
<b>2 - Capítulo V. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos</b>	<b>Página</b>
Tabela 1- Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com PRP e os valores de $p$ calculados.	72
<b>3 - Capítulo VI. Associação de células-tronco mesenquimais com plasma rico em plaquetas na reparação de defeitos críticos em calvária de camundongos</b>	<b>Página</b>
Tabela 1- Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com MSC/PRP e os valores de $p$ calculados.	95

## RESUMO

MONTEIRO, Betânia Souza, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009. **Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

O tecido ósseo é um tecido dinâmico continuamente submetido à processos de remodelação importantes para a manutenção da homeostase tecidual e reparação dos microtraumas aos quais submete-se diariamente. Essa reparação é um processo complexo que envolve quimiotaxia e adesão de células indiferenciadas e jovens à matriz óssea desmineralizada e seqüente proliferação e diferenciação em osteoblasto, seguida por uma fase de organização e estruturação do tecido formado. A participação de proteínas regulatórias coordenando a biologia celular e molecular da osteogênese está cada vez mais evidenciada na literatura e dentre essas proteínas, destacam-se os fatores de crescimento produzidos e liberados pelo plasma rico em plaquetas (PRP) e pelas células-tronco mesenquimais (MSC). As perspectivas de estabelecer terapias celulares utilizando o PRP e as MSC para tratar tecidos lesados e/ou com pequena capacidade de regeneração são promissoras e estudos clínicos estão sendo realizados, apresentando resultados muito animadores. O presente trabalho objetivou avaliar a contribuição das MSC utilizadas de forma isolada e associadas ao PRP nos processos de reparação óssea de defeitos críticos produzidos em calvária de camundongos isogênicos C57BL/6. Foram avaliados quatro grupos experimentais, cada grupo contendo 12 camundongos, que receberam tratamentos distintos com *pellet* de MSC, gel de plaquetas, associação MSC/PRP e um grupo que não recebeu tratamento. Foram realizadas avaliações macroscópicas, estatísticas, microscópicas e moleculares e constatou-se que o emprego das MSC derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup>, associadas ou não com PRP e a aplicação do gel de plaquetas de forma isolada, aplicados em defeitos ósseos críticos produzidos em calvária de camundongos jovens contribuem positivamente para o processo de reparação óssea. Dentre os tratamentos realizados observa-se que os resultados obtidos nos grupos que utilizaram as MSC isoladamente ou associada ao PRP são similares e melhores, seguido pelo grupo tratado com PRP isolado, e por fim, grupo controle.

## ABSTRACT

MONTEIRO, Betânia Souza, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, June of 2009. **Treatment of critical defects in mice calvarial with mesenchymal stem cells associated or not with platelet-rich plasma.** Adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo. Co-advisers: Marlene Isabel Vargas Vitoria and Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

Bone tissue is continuously subjected to dynamic remodeling processes that are important for tissue homeostasis maintenance and micro injuries repair. This repair is a complex process that involves chemotaxis and adhesion of undifferentiated and young cells to demineralized bone matrix and sequential proliferation and differentiation of osteoblasts, followed by a phase of organization of the formed tissue. Literature evidences the participation of regulatory proteins coordinating the cell and molecular biology of osteogenesis and among these proteins are the growth factor produced and released by platelet-rich plasma (PRP) and the mesenchymal stem cells (MSC). Prospects of establishing cell therapies using the PRP and the MSC to treat injured tissues and/or with little capacity for regeneration are promising and clinical studies are being conducted, showing very encouraging results. This study evaluated the contribution of MSC used isolated and associated with platelet-rich plasma in the bone repair processes of critical defects produced in calvarial of isogenic mice C57BL/6. Four experimental groups were evaluated, each group containing 12 mice that received different treatments with MSC pellet, platelets in gel, association of MSC/PRP and a group didn't received treatment. Macroscopic, statistics, microscopic and molecular evaluations were realized and demonstrated that there was positive contribution for repairing bone critical defects produced in calvarial of young mice treated with mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow of mice C57BL / 6 GFP +, isolated and associated with of PRP, and platelet in gel isolated. Among all the realized treatments the better results were obtained in the groups that used MSC alone or combined with PRP, followed by the group treated with PRP alone, and finally, the control group.

## *Capítulo I*

### **Células-tronco, fatores de crescimento e plasticidade**

**Publicado no periódico: *Ciência Veterinária nos Trópicos***  
*Ciênc. Vet. Trop.*, volume 11, suplemento 1, p.167-169, 2008.

ISSN: 1415-6326

Revista oficial:

*Conselho Regional de medicina veterinária de Pernambuco (CRMV-PE)*

Indexação: CABI ABSTRACTS, AGRIS e AGROBASE

Editor: CRMV-PE

# CÉLULAS-TRONCO E FATORES DE CRESCIMENTO NA REPARAÇÃO TECIDUAL

Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>1</sup>

Betânia Souza Monteiro<sup>2</sup>

Napoleão Martins Argôlo Neto<sup>3</sup>

## Introdução

A década de 90 foi marcada por importantes avanços nas pesquisas com terapia celular objetivando o tratamento de doenças hereditárias, auto-imunes e demais patologias com poucas perspectivas terapêuticas. Entretanto, até então, a terapia celular esteve restrita à utilização de células hematopoiéticas no tratamento de doenças hematológicas e onco-hematológicas.

A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação (direta ou indireta) e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (Herzog *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2006). Atualmente, a possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu inigualável potencial terapêutico e tornou-se a principal alternativa da terapia celular (Lai *et al.*, 2007).

No bojo destas descobertas encontram-se pacientes ávidos por tratamento de enfermidades com prognóstico desfavorável e o apelo da mídia para o incentivo às pesquisas com células-tronco. O governo Brasileiro recentemente abriu linhas de crédito para pesquisas na área de terapia reparativa de tecidos com células-tronco, entretanto, até o presente momento, a terapia aplicada com células-tronco embrionárias humanas é proibida no Brasil .

---

<sup>1</sup> Professor Titular de Cirurgia e Obstetrícia Veterinárias; Pesquisador bolsista produtividade CNPq. Diretor do Centro de Ciências Biológicas da UFV e Membro da Comissão de Biotecnologia e Biossegurança do Conselho Federal de Medicina Veterinária. CRMV-MG 1759.

<sup>2</sup> Médica Veterinária. Mestre em ortopedia cirúrgica de pequenos animais. Doutoranda em ortopedia cirúrgica de pequenos animais pela UFV. CRMV-MG 7043.

<sup>3</sup> Médico Veterinário. Mestre em clínica médica de pequenos animais. Doutorando em clínica médica de pequenos animais pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). CRMV-MG 7588.

\* nota dos autores: no dia 29 de maio de 2008, por seis votos contra cinco, o Supremo Tribunal Federal (STF) liberou as pesquisas científicas com células-tronco embrionárias sem nenhuma restrição, como previsto na Lei de Biossegurança. Data posterior a publicação do artigo original.

## **Células-tronco**

Em todos os animais vertebrados são encontrados dois tipos de células-tronco (CT): as células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA), recentemente também denominadas células-tronco somáticas.

As CTE podem ser obtidas do zigoto e da cavidade interna do pré-embrião (blastocisto). Embora as atuais técnicas de coleta dessas células sejam realizadas em pré-embriões não aptos para a implantação e nidadação, por questões éticas e religiosas, as pesquisas utilizando CT de embriões humanos ainda não são permitidas em muitos países do mundo (Yamanaka, 2007). No Brasil, a legislação permite a retirada dessas células de blastocistos para pesquisas *in vitro*, porém ainda não é permitida a aplicação terapêutica dessas células em humanos. Por este motivo, pouco se conhece sobre as interações moleculares e sinalização celular dessas células com outros tecidos orgânicos e os avanços científicos obtidos advêm de pesquisas com CTE de animais, como modelo biológico ao comportamento das CTE humanas.

Diferentemente das CTA, as CTE devem ser diferenciadas *in vitro* antes de sua implantação, pois os diferentes estímulos teciduais podem induzir a uma diferenciação desorganizada *in vivo*, originando tecidos neoplásicos (teratomas).

Estas especificidades estimularam as pesquisas com CTA, que podem ser coletadas de forma inócua, de quase todos os tecidos adultos, não infringindo questões éticas, morais ou religiosas. Não obstante, demonstrou-se que as algumas populações de CTA exibem propriedades de plasticidade semelhante às CTE, podendo originar tipos celulares de linhagem embriológica diferente da sua própria gênese (De Kretser, 2007). As possibilidades de utilização dessas células são tão amplas que relatos recentes demonstram a obtenção de CTE a partir da transdiferenciação indireta de CTA ectodermis (Meissner *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

### **Diferenciação da CTA**

A diferenciação das CTA é subordinada aos estímulos bioquímicos produzidos pelo tecido (nicho) ou meio de cultura no qual a célula está inserida. Tais estímulos, em sua maioria, decorrem da ação de peptídeos semelhantes a hormônios, que como tais, regulam a atividade celular. Estes peptídeos são denominados de fatores de crescimento

(FC) e podem ser produzidos autocrinamente pela célula alvo ou liberados através da membrana plasmática das células adjacentes, modulando a atividade celular (Takahashi *et al.*, 2007).

Diferentemente dos hormônios, os FC possuem uma meia-vida curta e são secretados em pequenas concentrações por ampla variedade de tecidos. Atualmente, estão identificados mais de 130 FC, muitos deles associados ao sistema imunológico, recebendo a nomenclatura de citocinas.

Embora o mecanismo exato da ação dos FC, sobre a atividade das CTA, não esteja completamente elucidado, reconhece-se que estas células se diferenciarão no tipo celular do tecido no qual se encontram, mediante esse estímulo. Inicialmente, acreditava-se que as CTA originavam linhagens celulares diferentes apenas por transdiferenciação e diferenciação. Segundo estas teorias, as CTA, sob estímulos específicos, sofrem transformação estrutural e funcional, originando tipos celulares distintos (Herzog *et al.*, 2003). Porém, outro estudo demonstrou que as CTA caracterizadas anteriormente como transdiferenciadas apresentavam padrão de fluorescência semelhante à célula somática do tecido sugerindo, na verdade, uma fusão celular (McKinney-freeman *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004).

Assim, atualmente admite-se que a plasticidade das CTA pode ser explicada por transdiferenciação (ou de-diferenciação), diferenciação e também por fusão celular, segundo a qual a CTA assume o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se fundiu (Herzog *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2006).

Na reparação óssea, as CTA recebem estímulos pró-mesenquimais, liberados diretamente pelos FC produzidos pelos tipos celulares envolvidos. Os principais FC envolvidos nesse processo são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular (EGF), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e o fator de crescimento insulínico (IGF) (Macdonald *et al.*, 2007). Estes FC estimulam, em maior ou menor grau, a organização do tecido conjuntivo, angiogênese, deposição de matriz extracelular, quimiotaxia de células osteoprogenitoras e formação do tecido de granulação. Desta forma, as CTA diferenciar-se-ão nos tipos celulares do tecido conjuntivo e ósseo. Entretanto, pouco se sabe sobre que sinalização celular determinará quais CTA migrarão ao sítio lesional ósseo para originar osteoblastos e quais se diferenciarão em fibroblastos.

No processo de cicatrização cutânea, o TGF- $\beta$ , ativinas, EGF, PDGF, fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), IGF e o fator de crescimento epidermal (EPGF) contribuem para a organização do tecido conjuntivo e formação de ceratinócitos (Eming *et al.*, 2008). À medida que o processo cicatricial avança, os estímulos mesenquimais são sobrepujados pelos estímulos ectodermiais. O TGF- $\beta$  por exemplo, durante a fase aguda da inflamação, inibe a diferenciação de ceratinócitos. Entretanto, durante a fase de reepitelização, estimula a migração dos ceratinócitos pela matriz de fibronectina neoformada. O EPGF, por outro lado, inibe a apoptose de ceratinócitos e diminui a resposta celular aos estímulos do TGF- $\beta$  e FGF.

## **Considerações**

Mediante o exposto, está estabelecido que os FC liberados tanto na reparação óssea quanto na cutânea são similares. Mas, a plasticidade das CTA no tipo tecidual específico é dependente da interação destes FC liberados pelas células presentes no local da reparação; do sinergismo e antagonismo entre eles e da quantidade, intensidade e duração do estímulo produzido.

Elucidar como ocorre a sinalização celular para a diferenciação das CTA, permitirá avanços significativos na terapia reparativa de tecidos, por meio da aplicação de estímulos exógenos específicos sobre as células no local da lesão e em culturas celulares.

## **Referências**

DE KRETZER, D. Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. *Journal of Law and Medicine*. v.15, n.2, p. 212-218, 2007.

EMING, S.A.; BRACHVOGEL, B.; ODORISIO, T.; KOCH, M. Skin homeostasis during inflammation: a role for nerve growth factor. *Histology and Histopathology*. v. 23, n. 1, p.1-10, 2008.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. v.102, p.3483-3493, 2003.

JACKSON, K.A.; SNYDER, D.S.; GOODELL, M.A. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potencial for stem cells engraftment artifacts. *Stem Cells*. n.22, p.180-187, 2004.

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2007). doi:10.1016/j.addr.2007.08.039 (prelo).

MACDONALD, K.K.; CHEUNG, C.Y.; ANSETH, K.S. Cellular delivery of TGFbeta(1) promotes osteoinductive signalling for bone regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. v.1, n.4, p. 314-317, 2007.

McKINNEY-FREEMAN, S.L.; JACKSON, K.A.; CAMARGO, F.D.; FERRARI, G.; MAVILIO, F.; GOODELL, M.A. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.99, n.3, p.1341-1346, 2002.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. v.119, p.2204-2213, 2006.

MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. v. 25, p. 1177 – 1181, 2007.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M. et al., Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (prelo).

YAMANAKA, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. v. 1; p. 39–49, 2007.

## *Capítulo II*

### **Células-tronco mesenquimais: uma breve revisão**

*Manuscrito em preparação*

**Submetido à revista: CIÊNCIA RURAL**

ISSN: 0103-8478

Revista oficial:

*Universidade Federal de Santa Maria*

Indexação: AGRINDEX; AGROBASE; CAB ABSTRACTS ;  
CHEMICAL ABSTRACTS; CROSS REF; EMBiology; FSTA;  
INDEX COPERNICUS; LILACS; METEOROLOGICAL &  
GEOASTROPHYSICAL ABSTRACTS; SciELO; SCOPUS; WEB  
OF SCIENCE ( Thomson Reuters); WILSON BIOLOGICAL;  
AGRICULTURAL INDEX PLUSX

## **Células-tronco mesenquimais (MSC): uma breve revisão**

### **Mesenchymal Stem Cell: Short Review**

**Betânia Souza Monteiro<sup>1</sup>, Napoleão Martins Argôlo Neto<sup>2</sup>, Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>3</sup>.**

#### **- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -**

#### **RESUMO**

Dentre todas as células-tronco estudadas até o presente momento, as mesenquimais (MSC) destacam-se por sua elevada plasticidade, podendo originar tecidos mesodermis e não mesodermis. Além disso, possuem características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica. As MSC secretam uma grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias e fatores de crescimento e, por meio dessas moléculas bioativas, proporcionam a modulação da resposta inflamatória, re-estabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostasia tissular e imunológica sob condições fisiológicas. Também podem induzir as demais células presentes no nicho tecidual a secretarem outros fatores solúveis que estimulam a diferenciação dessas células indiferenciadas, favorecendo o processo de reparação. A terapia celular com MSC é uma alternativa terapêutica promissora, porém a

---

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. E-mail: betaniamonteiro@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutorando em Medicina Veterinária, DVT, UFV, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: argolo\_napoleao@hotmail.com

<sup>3</sup> Professor Titular, DVT, UFV, Pesquisador CNPq. Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: ricardo@ufv.br Autor para correspondência.

compreensão da biologia dessas células ainda é uma ciência em formação. Este artigo tem por objetivo realizar uma breve revisão sobre as células mesenquimais indiferenciadas.

**Palavras-chave:** Terapia celular, propriedades imunológicas, fatores solúveis, citocinas, reparação tecidual.

## **ABSTRACT**

Of all the stem cells studied so far, the mesenchymal stem cells (MSC) stand out for their high plasticity and capacity of generating mesodermal and non-mesodermal tissues. In addition, immunomodulatory and immunosuppressive features that expand possibilities for therapeutic use are present in these cells. A variety of pro and anti-inflammatory cytokines and growth factors are secreted for MSC and provide a modulation of inflammatory response, re-establishment of vascular supply and adequate repair of the tissue, allowing the return of homeostasis original under physiologic conditions. Therefore, they can induce secretion of soluble factors that stimulate their differentiation by other cells present at the niche's tissue, promoting the repair process. Cell therapy using MSC is a promising therapeutic alternative, but biology understanding these cells is formation science yet. The aim of the article is to conduct a short review of these undifferentiated mesenchymal cells.

**Key words:** Cell therapy, immunological properties, growth factors, cytokines, tissue repair.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (MSC) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea (MO), tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al, 2008; MAMBELLI et al., 2009; ZUCCONI et al., 2009). A MO constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoéticas e endoteliais (PITTENGER et al., 1999; MINGUELL et al., 2000).

As MSC caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir muitos tipos celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, entre outras (PITTENGER et al., 1999). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular.

Em culturas e em condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastóide, adesão em substrato plástico, auto-renovação e diferenciação em tipos celulares distintos (MENDELOW et al., 1980; PITTENGER et al., 1999; NARDI & MEIRELLES, 2006). Podem ser expandidas por mais de 40 gerações mantendo capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições (DEANS & MOSELEY, 2000).

As MSC expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (HUSS, 2000; BOBIS et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; CAPLAN, 2009).

## **PLASTICIDADE DAS MSC**

De todas as linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o presente momento, as MSC apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (MEIRELLES et al., 2006). Contudo, os mecanismos de plasticidade não são totalmente compreendidos.

Inicialmente acreditava-se que as MSC originavam linhagens celulares diferentes por transdiferenciação. Segundo essa teoria, elas alterariam sua expressão gênica para a de uma linhagem celular completamente diferente, originando tipos celulares distintos (HERZOG et al., 2003). A transdiferenciação pode ocorrer de forma direta, quando a célula altera seu citoesqueleto e síntese protéica para rediferenciar-se em outro tipo celular específico, ou indireta, quando desdiferencia-se em uma célula-tronco mais primitiva para, posteriormente, se re-diferenciar em outro tipo celular (VERFAILLIE, 2002; HERZOG et al., 2003).

Outro mecanismo de diferenciação celular proposto é a fusão. Acredita-se que as MSC podem fusionar-se a uma célula adulta alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se uniu. A fusão celular é um fenômeno biológico amplamente conhecido, ocorrendo principalmente nas células cuja poliploidia (dois ou

mais conjuntos de cromossomos) é comumente vista, como em hepatócitos e células musculares esqueléticas (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006).

Além disso, as MSC secretam uma grande variedade de quimiocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento. Dessa forma, as MSC interagem com as células residentes (nicho) e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com esta sinalização (TAKAHASHI et al., 2007).

## **PERICITOS e MSC**

Os pericitos são células presentes na parede vascular de arteríolas pré-capilares e nas pequenas artérias e veias (HIRSCHI e D'AMORE, 1996; MEIRELLES et al., 2008). São conhecidas também como células periendoteliais, célula reticular adventicial ou células de Rouget, as quais estão embebidas na membrana basal, onde entram em contato com o endotélio vascular e células endoteliais (HIRSCHI e D'AMORE, 1996; ARMULIK et al., 2005; MEIRELLES et al., 2008).

Alguns estudos evidenciaram que os pericitos são células multipotentes com capacidade de se diferenciar em condrócitos, adipócitos e osteoblastos, fato que explica, por exemplo, a calcificação patológica dos vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, e músculo esquelético (HIRSCHI e D'AMORE, 1996; MEIRELLES et al., 2008). Ademais, recentes pesquisas demonstram que existem semelhanças entre os marcadores de superfície expressos pelas MSC e pericitos (CAPLAN, 2008) e que os pericitos são as células que, in vivo, mais se assemelham e correspondem às culturas de MSC (MEIRELLES et al., 2006; CAPLAN, 2008; MEIRELLES et al., 2008). Por essas

evidências, definiu-se que todas as MSC são pericitos, mas, nem todas as células que estão localizadas na região perivascular são MSC, como por exemplo, as células-tronco neural e a hematopoética (HIRSCHI e D'AMORE, 1996; CAPLAN, 2008).

## **IMUNIFENOTIPAGEM**

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a “marca” das células que os contêm (COVAS, 2006). Contudo, as MSC apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos (ALHADLAQ & MAO, 2004; MEIRELLES et al, 2006), sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos. Esta imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular, conforme demonstrado em estudos contemporâneos (MEIRELLES et al, 2006; LOJUDICE, 2008).

A população de MSC isoladas da medula óssea de humanos e camundongos expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina – marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM – moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA-β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1(estroma de suporte da hematopose) e Sca-1 (GRONTHOS et al., 2003; KOLF et al.,2007; PHINNEY & PROCKOP, 2007) . KOLF et al. (2007) afirmaram que o marcador Stro-1

é o melhor marcador a se investigar quando se deseja pesquisar a presença de MSC, entretanto, esse marcador é gradualmente perdido durante a expansão em culturas.

Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as MSC não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais, como por exemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mielóides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoéticas). A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas (KOLF et al., 2007).

Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de MSC, a *International Society for Cellular Therapy* concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoéticos, é suficiente para a imunofenotipagem destas células. Contudo, esta caracterização deve sempre estar acompanhada da demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura e da diferenciação das mesmas em pelo menos duas linhagens celulares distintas (HORWITZ et al., 2005).

## **PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS**

As MSC tornaram-se foco de atenção terapêutica devido seu potencial imunomodulatório (WAN et al., 2008), embora os mecanismos de imunossupressão sobre a resposta inflamatória e sobre os mecanismos de rejeição ao transplante não estejam totalmente elucidados (PATEL et al., 2008).

Mediante um contato direto das MSC com um tecido (alogênico ou autólogo) ou mediante a interação parácrima com o interferon-gama ( $\text{INF-}\gamma$ ), produzido pelas células imune do organismo, as MSC desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno - APC) (CORCIONE et al., 2006; NAUTA & FIBBE, 2007). Dentre esses fatores estão as prostaglandinas (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), fator de crescimento transformador beta ( $\text{TGF-}\beta$ ), fator de crescimento hepatóide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (NAUTA & FIBBE, 2007).

A liberação de  $\text{TGF-}\beta$  e HGF suprime a proliferação dos linfócitos T e B (Di NICOLA et al., 2002), enquanto que a liberação de PGE2 inibe, especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos e demais citocinas pró-inflamatórias. A enzima IDO induz a apoptose dos linfócitos T por transformar o triptofano, que é um aminoácido essencial para a ativação dessas células, em produtos tóxicos no seu citoplasma (AGGARWAL & PITTENGER, 2005). De forma análoga aos mecanismos anteriormente descritos, a IDO, PGE2 e  $\text{TGF-}\beta$  induzem a perda do potencial citotóxico das células natural killer (NK), por suprimirem a produção de IL-2, IL-15 e  $\text{INF-}\gamma$  (SOTIROPOULOU et al., 2006).

Em relação às APC, evidenciou-se que as MSCs interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de PGE2 pelas MSCs inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ) e de  $\text{INF-}\gamma$  e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (AGGARWAL & PITTENGER, 2005; NAUTA & FIBBE, 2007).

Além dos efeitos imunossupressores, as MSC expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e níveis negligenciáveis de MHC-II (Le BLANC, 2003) e/ou não expressão MHC-II em sua superfície (CAPLAN, 2009). Durante o processo de seleção clonal positiva e negativa realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não-próprio), essas células utilizam o MHC para realizar tal seleção. Logo, na ausência de MHC, como verificado nas MSC, o processo de seleção de não-próprio não ocorre, impedindo que o organismo que recebeu essas células indiferenciadas as reconheçam como não-próprias e realize a rejeição das mesmas (WAN et al., 2008; MAJUMDAR et al., 2003).

Também, o contato célula-célula faz com que haja a produção, pelas MSC, de diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), e M-CSF e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (DEANS & MOSELEY, 2000; BOBIS et al.,2006).

## **A FUNÇÃO DA MSC NA REPARAÇÃO DOS TECIDOS**

A lesão tecidual ocasionada por traumas ou agentes químicos e/ou infecciosos pode resultar em perda anatômica e funcional da integridade dos tecidos. Imediatamente, uma seqüência complexa de eventos é desencadeada na tentativa de restaurar a integridade da área lesada (MARTIN, 1997).

Após a lesão tecidual, um coágulo se forma logo nos primeiros minutos; as plaquetas tornam-se ativadas e liberam de fatores de crescimento. Em seqüência, desenvolve-se um processo inflamatório envolvendo as células do sistema imune

(poucas horas após a lesão), primeiramente neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (resposta imune inata) e, posteriormente, linfócitos (resposta imune adquirida) (MARTIN, 1997; TSIROGIANNI et al., 2006). Os macrófagos, além de iniciarem a resposta inflamatória, fagocitam os debris celulares e, substâncias antigênicas interagem com as células da resposta adaptativa e produzem moléculas estimulatórias e mediadores inflamatórios que, inicialmente, ativam mecanismos e células participantes do processo de reparação (TSIROGIANNI et al., 2006).

Paralelamente à ocorrência da resposta inflamatória, as células endoteliais são ativadas pela lesão vascular e hipóxia tecidual, e mais células do sistema imune são quimioatraídas. Essa quebra na homeostasia tecidual gera um estímulo para a ativação do pericito/MSC. Em resposta a essa ativação e à perda de contato com as células endotélias e com a membrana basal, as células pericito/MSC proliferam-se, elevam o número de moléculas bioativas secretadas (fatores de crescimento e moléculas de adesão, principalmente), migram para o local de lesão e/ou por diapedese entram na corrente circulatória onde exercerão efeitos parácrinos (TSIROGIANNI et al., 2006; MEIRELLES et al., 2008).

As MSC também expressam uma grande variedade de receptores para quimiocinas e fatores de crescimento. Dessa forma, as MSC podem ser estimuladas pelas células residentes (nicho) a se diferenciar ou secretar fatores solúveis que estimularão outros nichos celulares. Dessa forma, quanto mais agudo o processo patológico ou quanto mais vascularizada a região afetada, mais intensa é a sinalização do nicho e mais efetiva será a resposta das MSC (FUCHS et al., 2004; MORRISON et al., 2008).

As moléculas bioativas secretadas pelas MSC exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando: (a) efeitos anti-apoptóticos nas células tecido-específico, (b) efeitos imunomodulatórios sobre as células do sistema imune, (c) aumento da angiogênese, e (d) quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação (MEIRELLES et al.,2008). Assim, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial, em algumas doenças isquêmicas, re-estabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares..

## **CONCLUSÕES**

A terapia celular com MSC é uma alternativa terapêutica promissora, pois a diferenciação destas células em tecidos mesodermis e não mesodermis amplia as possibilidades de utilização clínica tanto em humanos quanto em animais. Além disso, as recentes descobertas sobre o comportamento imunológico das MSC aumentaram as perspectivas terapêuticas com o uso destas células pela possibilidade de tratamento alógeno. Contudo, esta possibilidade deve ser considerada com entusiasmo e cautela, visto que os mecanismos moleculares imunomodulatórios utilizados pelas MSC ainda não são totalmente compreendidos e a biologia das MSC ainda é uma ciência em formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecimentos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsas de estudo ao primeiro e segundo autor e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de produtividade ao terceiro autor.

## **REFERÊNCIAS**

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

ALHADLAQ, A.; MAO, J.J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Development**, v.13, p. 436–448, 2004. doi:10.1089/scd.2004.13.436.

ARMULIK, A. et al. Endothelial/pericyte interactions. **Circulation Research**, v.97, p. 512-523, 2005. doi: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.

BOBIS, S. et al. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.

CAPLAN, A.I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, v.3, p. 229-230, 2008. doi:10.1016/j.stem.2008.08.008.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p. 318-324, 2009. doi: 10.1002/path.2469.

COVAS, D.T. Células-Tronco Mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Célulastronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: ATHENEU, 2006. p. 35-

CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, p. 367–372, 2006.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p. 875-884, 2000.

Di NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, p.3838-3843, 2002.

FUCHS, E. et al. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. **Cell**, v. 116, p.769–778, 2004. doi:10.1016/S0092-8674(04)00255-7.

GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, v.116, p. 1827-1835, 2003. doi: 10.1242/jcs.00369.

HERZOG, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.

HIRSCHI, K.K.; D'AMORE, P.A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, v.32, p. 687-698, 1996.

HORWITZ, E.M et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, v.7, n.5, p. 393-395, 2005.

HUSS, R. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34–hematopoietic and mesenchymal stem. **Stem Cells**, v. 18, n.1, p. 1-9, 2000.

KOLF, C.M. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 204 – 213, 2007. doi:10.1186/ar2116.

Le BLANC, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, v. 6, p. 485– 489, 2003.

LOUJUDICE, F. H. **Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco progenitoras mesenquimais**. [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 173p, 2008.

MAJUMDAR, M.K. et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, p. 228-241, 2003.

MAMBELLI, L.I. et al. Characterization of equine adipose tissue–derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v.15, n.1, p.87-94, 1999.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997. doi: 10.1126/science.276.5309.75.

MEIRELLES, L.S. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, p.2204-2213, 2006. doi: 10.1242/jcs.02932.

MEIRELLES, L.S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p. 2287-2299, 2008. doi:10.1634/stemcells.2007-1122.

MENDELOW B, D et al. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. **British Journal of Haematology**, v.46, p.15-22, 1980.

MINGUELL, J.J. et al. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p. 881-887, 2000. doi: 10.1590/S0100-879X2000000800003.

MORRISON, S.J. et al. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. **Cell**, v.132, p. 598-611, 2008.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**, v.110, n.10, p.3499 – 3506, 2007.

NARDI, N.B; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p.249-282, 2006.

PATEL, S.A. et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2008. doi: 10.1007/s00005-008-0001-x.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. **Stem Cells**, v. 25, p. 2896-2902, 2007. doi:10.1634/stemcells.2007-0637.

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

SOTIROPOULOU, P.A. et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 74 – 85, 2006. doi:10.1634/stemcells.2004-0359.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p.1-12, 2007.

TSIROGIANNI, A.K. et al. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 375, p. S5-S12, 2006. doi:10.1016/j.injury.2006.02.035.

VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**, v. 12, p.502-508, 2002. [doi:10.1016/S0962-8924\(02\)02386-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02386-3).

WAN, C.D et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.**, v. 7, p.29-33, 2008.

ZUCCONI, E. et al. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development.** *in proof* p.1-33, 2009. (doi: 10.1089/scd.2008.0314.)

## *Capítulo III*

# **Avanços no estudo de célula-tronco no Brasil e suas implicações**

*Manuscrito em preparação*

**Submetido à revista: CERES**

ISSN: 0034-737X

Revista oficial:

*Universidade Federal de Viçosa*

# AVANÇOS NO ESTUDO DE CÉLULAS-TRONCO NO BRASIL

## E SUAS IMPLICAÇÕES

Ricardo Junqueira Del Carlo<sup>1</sup>, Betânia Souza Monteiro<sup>2</sup>, Napoleão Martins Argôlo Neto<sup>2</sup>

### RESUMO

As recentes descobertas sobre o comportamento *in vitro* das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), assim como o aperfeiçoamento metodológico das técnicas de cultivo e aplicação clínica experimental incentivaram o apelo popular no Brasil pela liberação irrestrita das pesquisas com células-tronco (CT). Atualmente, mais um tipo de CT foi criada pela comunidade científica e nomeada de CT pluripotentes induzidas (iPS). Pesquisas com finalidades terapêuticas, envolvendo CTE, devem ser realizadas de forma cautelosa e, enquanto não se desvendar toda a biologia destas *in vivo*, deve-se prosseguir com as pesquisas *in vitro*. Dentre todas as linhagens de CTS estudadas até o presente momento, as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis. No Brasil, há um grande número de testes clínicos em andamento com CTS, em humanos, que avaliam o uso terapêutico destas células em diferentes doenças e recentemente, desenvolveu-se também a tecnologia para a criação de células iPS. Apesar da enorme expectativa quanto ao uso terapêutico desse tipo celular sua aplicação em humanos ainda não é aconselhada. As pesquisas com as diferentes linhagens de CT devem ser acompanhadas com entusiasmo e cautela. Ainda se desconhece quais tipos de CT contribuirão

---

<sup>1</sup> Professor Titular de Cirurgia e Obstetrícia Veterinárias, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (UFV), MG. Pesquisador CNPq. E-mail: [ricarlo@ufv.br](mailto:ricarlo@ufv.br). Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Médico (a) Veterinário (a), Mestre em Medicina Veterinária. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT/UFV, Viçosa, MG.

positivamente para o tratamento de enfermidades humanas, tampouco quais doenças poderão ser tratadas. A biologia das CT ainda é uma ciência em formação e a cada dia surgem novas evidências que refutam ou corroboram o conhecimento atual.

**Palavras chave:** células-tronco, células-tronco embrionárias, células-tronco somáticas, células-tronco pluripotentes induzidas, terapia celular.

## **ABSTRACT**

### **PROGRESSES AND INVOLVEMENTS IN BRAZIL'S STEM CELL RESEARCH**

Recent discoveries about *in vitro* behavior of embryonic stem cells (ESC) and somatic (SSC), as well as methodological improvements in culture techniques and experimental clinical application encouraged popular appeal for unrestricted release of research with stem cells (SC). Currently, was created another type of SC and named induced pluripotent stem (iPS) cell, for the scientific community. Research with therapeutic goal, involving ESC, must be carried out cautiously and, while not elucidate, *in vivo*, all biology these, should continue with *in vitro* studies. Among all SSC lineage studied until this moment, the mesenchymal stem cells (MSC) have greater plasticity, originated no-mesoderm and mesoderm tissues. In Brazil, there are a large number of SSC clinical trials progressing in humans, which measure the therapeutic use of these cells in different diseases and recently, also has developed the technology for creating iPS cells. Despite the expectation enormous about therapeutic use this cell type isn't recommended its application in humans. The research with the different SC lineage should be accompanied with enthusiasm and caution. Unknown which types of SC will contribute positively to the treatment of human's diseases and what diseases can be

treated. The biology of SC is still a science in training and every day appear new evidences that corroborate or refute the current knowledge.

**Key words:** stem cell, embryonic stem cell, somatic stem cell, induced pluripotent stem cell, cellular therapy.

## **INTRODUÇÃO**

As recentes descobertas sobre a biologia das células-tronco embrionárias (CTE) e somáticas (CTS), bem como o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo e aplicação clínica experimental incentivaram o apelo popular no Brasil pela liberação irrestrita das pesquisas com células-tronco (CT) (Albuquerque, 2009). Tal apelo foi motivado, em parte, pelo sensacionalismo com o qual os meios de comunicação abordam as perspectivas terapêuticas (Leite, 2009).

Fruto desse apoio popular e apelo da mídia, o Supremo Tribunal Federal (STF) liberou as pesquisas científicas com CTE sem nenhuma restrição, como previsto na Lei de Biossegurança de 29 de maio de 2008. O fato do Brasil possuir uma legislação específica sobre pesquisa e utilização terapêutica de CT, quando muitos países ainda não a possuem, coloca-o em posição de destaque na comunidade científica internacional (Burgardt, 2009). Além disso, garante a continuidade das pesquisas com CTE que estavam suspensas por infringir antigos preceitos éticos e reitera a imagem do Brasil como estado laico, no qual as decisões políticas não são pautadas em crenças religiosas (Paese, 2007).

Apesar dos possíveis avanços para as pesquisas com CTE, que a aprovação da lei de biossegurança poderá proporcionar, a maioria dos laboratórios dos principais centros de pesquisa brasileiros ainda não possuem estrutura adequada para esse tipo de

estudo (Cimieri, 2009). Para sanar este problema, o governo Brasileiro recentemente disponibilizou 13 milhões de reais do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e 10,6 milhões de reais, conjuntamente, dos Ministérios da Saúde e da Ciência e Tecnologia para reestruturar os principais centros de pesquisas do país.

Esta iniciativa do Governo Federal propiciará, ainda, a construção de oito centros de pesquisa em terapia celular, com o objetivo de estabelecer logística para a produção de vários tipos de CT (adultas, induzidas e embrionárias) e fornece-las, gratuitamente, aos demais grupos de pesquisa interessados.

Além dos oito centros, o governo e o CNPq está investindo em 49 projetos de pesquisa com terapia celular com CTE e CTS, dentre os quais destaca-se as pesquisas com doenças cardíacas degenerativas humanas (Instituto Nacional de Cardiologia de Laranjeiras – RJ), diabetes humana (Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP) e doenças de Chagas (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – BA) (Cimieri, 2009).

Na Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada no estado de Minas Gerais, um grupo de pesquisa certificado pela Instituição, denominado “células-tronco mesenquimais e terapia reparativa” e registrado no CNPq, realiza estudos com a utilização de CTS e, vem recebendo apoio financeiro de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

O objetivo deste artigo é relatar os avanços obtidos, até o momento, no estudo de CT no Brasil, e suas conseqüências para a terapia reparativa.

## **CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS**

As CTE são células indiferenciadas, denominadas totipotentes, pois podem originar quaisquer tecidos animais. Há 28 anos foram isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos murinos e cultivadas *in vitro* (Evans & Kaufman, 1981; Zago & Covas, 2004; Alison, 2009). Posteriormente, no final da década de 90, utilizando os conhecimentos adquiridos a partir da cultura murina, as CTE humanas foram isoladas e cultivadas de pré-embriões fertilizados *in vitro*, não aptos a serem implantados e doados para propósito de pesquisa, com consentimento dos doadores (Thomson *et al.*, 1998, Hurlbut, 2007, Alison, 2009).

Entre o período de 2005 a 2008, antes da aprovação da Lei de Biossegurança do Brasil, alguns centros de pesquisas credenciados (Instituto de Biociências da USP em parceria com o Programa de Oncobiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ) pelo Governo Federal realizavam pesquisas utilizando CTE humanas advindas de laboratórios norte-americanos, focadas nos aspectos básicos da morfofisiologia destas células (Zago & Covas, 2004; Baroni, 2008).

Estes estudos confirmaram propriedades interessantes destas CT como a formação de estrutura tridimensionais esféricas denominadas corpos embrióides (CE). Os CE são agregados de células diferenciadas que simulam o desenvolvimento de embriões pré-implantados contendo as três camadas embrionárias: mesoderma, ectoderma e endoderma (Kerkis *et al.*, 2001, Sukoyan *et al.*, 2002). Nesses CE foi possível estudar os mecanismos de diferenciação celular até a geração de linhagens celulares somáticas, o processo de inativação do cromossomo X e os efeitos de substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário *in vitro* (Kerkis *et al.*, 2001; Zago & Covas, 2004).

Não obstante, em outros países, a maioria dos trabalhos desenvolvidos na área de CTE também se relacionam à ciência básica e apesar da enorme expectativa do uso terapêutico dessas células, até julho de 2007, não havia relato de nenhum teste clínico com CTE em seres humanos, em andamento no mundo (Pereira, 2008).

Após a validação da Lei de Biossegurança do Brasil, pesquisadores do Instituto de Biociências da USP em parceria com o Programa de Oncobiologia da UFRJ obtiveram a primeira linhagem de CTE, em outubro de 2008, denominada **BR-1**. Esses estudos foram iniciados no final de 2005 e, mesmo durante a tramitação da validade da lei no STF, o Governo Federal apoiou o desenvolvimento dessas pesquisas (Baroni, 2008; Pereira, 2008).

Decorrente desse avanço, o Brasil tornou-se independente da necessidade de importação de culturas primárias de CTE, facilitando o desenvolvimento de novas pesquisas no país. Ademais, os futuros resultados poderão ser compartilhados com todos os cientistas brasileiros, por meio da Rede Nacional de Terapia Celular, com a finalidade de centralizar as informações, além de oferecer treinamento aos pesquisadores que desejarem realizar cultivo de novas linhagens de CT (Baroni, 2008).

Embora haja a expectativa que a BR-1 impulse a pesquisa clínica com CTE no Brasil, alguns pesquisadores afirmam que os avanços obtidos são apenas metodológicos. Outras linhagens, como a brasileira, já foram estabelecidas e a maior contribuição da BR-1, até o momento, é o domínio da metodologia de cultivo, fato de impacto positivo tanto para os cientistas brasileiros quanto para a sociedade (Nardi, comunicação pessoal)<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> Nardi, N. Comunicação pessoal. Porto alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Outubro de 2008.

Pereira (2008) afirmou que as primeiras pesquisas científicas utilizando células diferenciadas a partir das CTE em seres humanos, sob estrito controle científico, devem ter início em 2009, nos Estados Unidos e na Inglaterra. Contudo, esse autor reconheceu que apesar de todo o imenso potencial terapêutico dessas células, persistem ainda grandes incertezas sobre o seu comportamento *in vivo*, já que existem alguns riscos, entre eles o desenvolvimento de certos cânceres.

As pesquisas com finalidades terapêuticas, envolvendo CTE, devem ser realizadas de forma cautelosa e enquanto não se desvendar toda a biologia das CTE *in vivo*, possibilitando sua aplicação como agente terapêutico, deve-se prosseguir com as pesquisas *in vitro*, pois essas podem fornecer conhecimentos básicos que contribuirão com benefícios à saúde humana.

## **CÉLULAS-TRONCO SOMÁTICAS**

As CTS são células não-diferenciadas presentes em todos os tecidos adultos, capazes de auto-renovação por períodos de tempo ainda indeterminados e de originar tipos celulares diferenciados morfofisiologicamente. Essas características permitem que as CTS realizem a reparação e manutenção de todos os tecidos do organismo (Pittenger *et al.*, 1999; Minguell *et al.*, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que as CTS possuíam seu potencial de diferenciação restrito somente às células do tecido no qual se encontram. Porém, nos últimos anos, diversas pesquisas têm demonstrado que algumas linhagens de CTS são capazes de originar tecidos diferentes de sua formação embrionária (Pereira, 2008).

Dentre todas as linhagens de CTS estudadas até o presente momento, as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (Zago & Covas, 2004; Meirelles *et al.*, 2006). Essas

células podem ser transplantadas para os sítios lesionais logo após a ocorrência da lesão tecidual e podem ser aplicadas na forma indiferenciada, recebendo o estímulo do meio para posterior diferenciação, ou sofrer diferenciação em cultura antes da implantação (Del Carlo *et al.*, 2004, Del Carlo *et al.*, 2008).

Em pesquisas com modelos animais, o grupo de pesquisa em reparação tecidual da UFV, em parceria com o Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), vem obtendo sucesso e demonstrando a contribuição positiva do transplante de CTM autólogas para a reparação de falhas ósseas e feridas cutâneas em camundongos diabéticos.

O efeito terapêutico positivo das CTS, em modelos animais, justifica o uso dessas células em ensaios clínicos em humanos. Dessa forma, no Brasil, há um grande número de testes clínicos em andamento com CTS, em humanos, que avaliam o uso terapêutico destas células em diferentes doenças, como doenças cardíacas, auto-imunes e trauma de medula espinhal. Estes estudos estão em andamento e os resultados preliminares indicam que pelo menos não há efeitos adversos do transplante autólogo de CTS da medula óssea. Contudo, os efeitos terapêuticos ainda são discutíveis, pois são necessários diversos estudos clínicos randômicos para se determinar a influencia dessas células sobre a biologia humana.

Em medicina humana, uma das áreas mais exploradas tem sido a cardiologia. Em um trabalho desenvolvido numa parceria entre a UFRJ, o Hospital Pró-Cardíaco e a Universidade do Texas, quatorze pacientes, com doença isquêmica grave do coração, receberam injeções de CTM autólogas de medula óssea diretamente na região isquêmica. Os resultados iniciais mostraram uma melhora significativa da função

contrátil nos pacientes tratados quando comparados com controles, após quatro meses do tratamento (Pereira, 2008).

Além das CTM, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) destacam-se pelo potencial terapêutico para tratamento de doenças onco-hematológicas. Por este motivo, o Brasil criou a rede BrasilCord, primeiro banco de cordão umbilical público nacional, que permite rapidez na localização de doadores compatíveis dentro de uma mesma população (Blanc, 2005). O Instituto Nacional do Câncer (INCA -RJ), integrante do BrasilCord, recentemente, deu um salto tecnológico em direção a auto-suficiência na estocagem de sangue de cordão umbilical. Através da obtenção de recursos não-reembolsáveis no valor 4,09 milhões de reais, junto ao BNDES, a capacidade de congelamento do INCA aumentará de três mil para 10.340 bolsas em 2009 (Montenegro, 2009).

Contudo, até recentemente, apenas o sangue de cordões umbilicais de partos realizados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo eram doados para o BrasilCord. Conseqüentemente, a variabilidade étnica das amostras desse banco de cordão pode ser muito baixa e não representar toda a diversidade genética da nossa população. A iniciativa da criação da rede de bancos públicos no Brasil é de extrema importância para a saúde da população, mas para que esta tenha impacto relevante, deve contemplar a natureza diversificada de nossa população, o que deve se refletir na escolha dos pontos de coleta e em um cálculo realista da meta de número de amostras armazenadas (Montenegro, 2009).

Novas fontes de CTS vêm sendo caracterizadas de lipoaspirado e da polpa do dente de leite humano. Ainda não se sabe quais dessas células cumprirão sua promessa

terapêutica, mas elas ilustram o quanto ainda temos que aprender sobre os diferentes nichos de CTS no organismo adulto (Zuk *et al.*, 2002; Kerkis *et al.*, 2007).

## **CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS**

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) são células geneticamente modificadas e reprogramadas que se originam de células somáticas ou de CTS, por meio de mecanismos de transfecção celular, gerando exemplares similares às células embrionárias (Takahashi *et al.*, 2007).

Esta recente descoberta envolve a reprogramação das células somáticas pela incorporação de genes que são altamente expressados pelas CTE, como os fatores Oct3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4, por meio de transdução retroviral (Takahashi & Yamanaka, 2006). Após a introdução desses fatores reprogramantes, ocorre ativação e produção de genes endógenos normalmente expressados pelas CTE, gerando células semelhantes às embrionárias, em relação à morfologia e funcionalidade (Yu & Thomson, 2008; Amabile & Meissner, 2009).

O Brasil é o quinto país do mundo a desenvolver tecnologia para a criação de células iPS obtidas sem a necessidade de embriões. Os primeiros estudos foram desenvolvidos por pesquisadores da UFRJ e os resultados foram apresentados em 2008. Para eles, a produção de células iPS representa um grande avanço para a ciência, sobretudo para a biomedicina. Em acréscimo, o fato de não serem provenientes de embriões permite que sejam derivadas diretamente de células dos pacientes a serem tratados (Escobar, 2009).

Apesar da enorme expectativa quanto ao uso terapêutico desse tipo celular sua aplicação em humanos ainda não é aconselhada. A única aplicação garantida dessas células, por enquanto, é em pesquisas básicas e em modelos animais, visando a geração

de modelos para estudos de doenças e testes de drogas *in vitro* (Amabile & Meissner, 2009). Tal opinião também é compartilhada entre os pesquisadores brasileiros (Escobar, 2009).

Toda essa cautela deve-se ao fato das iPS apresentarem os mesmos problemas intrínsecos das CTE, como o risco de formação de tumores e dificuldade de controlar a sua diferenciação *in vivo*, sendo esse risco ainda maior devido ao fato da reprogramação ser efetuada sob ação retroviral (Takahashi *et al.*, 2007).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As pesquisas com as diferentes linhagens de CT devem ser acompanhadas com entusiasmo e cautela. Ainda se desconhece quais tipos de CT contribuirão positivamente para o tratamento de enfermidades humanas, tampouco quais doenças poderão ser tratadas. A biologia das CT ainda é uma ciência em formação e a cada dia surgem novas evidências que refutam ou corroboram o conhecimento atual. Contudo, espera-se que as novas terapias com CT substituam tratamentos atuais, mais caros e, muitas vezes, ineficientes. Além disso, acredita-se que as CT são um importante modelo experimental para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e câncer, entre outros. Esses conhecimentos de biologia básica poderão proporcionar, a médio prazo, uma melhora da abordagem terapêutica às doenças humanas e animais.

## **REFERÊNCIAS**

Albuquerque F (2009) Pesquisas com células-tronco têm avanço no Brasil, diz pesquisadora. Disponível em: <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=pesquisas-com-celulas-tronco-tem-avanco-no-brasil&id=3788>. Acessado em: 10 de março de 2009.

Alison MR (2009) Stem cells in pathobiology and regenerative medicine. *Journal of Pathology*, 217: 141-143.

Amabile G & Meissner A (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in Molecular medicine*, 15: 59-68.

Baroni LL (2008) Cientistas brasileiros criam linhagem de células-tronco. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?materia=16753>. Acessado em: 10 de março de 2009.

Blanc V (2005) A polêmica do cordão. Disponível em: <http://www.revistaepoca.globo.com/Epoca/0,6993,EPT928441-1664,00.htm>. Acessado em: 10 de março de 2009.

Burgardt L (2009) O que muda com decisão do STF sobre células-tronco. Disponível em: <http://www.universia.com.br/materia/materia.jsp?materia=16144>. Acessado em: 10 de março de 2009.

Cimieri F (2009) País terá oito novos laboratórios para pesquisas com células-tronco. Disponível em: [http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090223/not\\_imp328545,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090223/not_imp328545,0.php). Acessado em: 10 de março de 2009.

Del Carlo RJ, Monteiro BS, Daibert APF & Pinheiro LCP (2004) Medula óssea autógena. Uma alternativa em ortopedia veterinária. *Revista Ceres*, 51: 411-418.

Del Carlo RJ, Monteiro BS & Argolo Neto NM (2008) Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 11: 167-169.

Escobar H (2009) Uso clínico de células iPS será difícil. Disponível em: [http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090129/not\\_imp314659,0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090129/not_imp314659,0.php). Acessado em: 10 de março de 2009.

Evans MJ & Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.

Hurlbut WB (2007). Ethics and embryonic stem cell research: altered nuclear transfer as a way forward. *Biodrugs*, 21:79-83.

Kerkis A, Soukoian M, Kerkis I, Merkel C, Mello MRB & Pereira LV (2001). Células-tronco embrionárias. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 20: 20-25.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI & Cerruti HF (2007) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing oct-4 and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues and Organs*, 184: 105-116.

Leite M (2009) Ciência em Dia: Células-tronco e sensacionalismo. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u7656.shtml>. Acessado em: 10 de março de 2009.

Meirelles LS, Chagastelles PC & Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119: 2204-2213.

Minguell JJ, Conget P & Erices A (2000) Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 33: 881-887.

Montenegro KB (2009) Banco de cordão umbilical: Brasil busca auto-suficiência. Disponível em: [http://www.ghente.org/temas/celulastronco/cordao\\_umbilical.htm](http://www.ghente.org/temas/celulastronco/cordao_umbilical.htm).

Acessado em: 10 de março de 2009.

Paese J (2007) Controvérsias na Tecnociência: O Caso da Lei de Biossegurança no Brasil. Tese de Doutorado. Centro de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 298p.

Pereira LV (2008). A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Ciência e Saúde Coletiva*, 3: 7-14.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.

Sukoyan MA, Kerkis AY, Mello MRB, Kerkis IE, Visintin JA & Pereira LV (2002) Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 535-542.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 1-12.

Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.

Zago MA & Covas DT (2004) Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. *Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso*, 1: 1-20.

Zuk A, Zhu M, Ashjian P, DeUgarte DA, Huang JI, Mizuno HH, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular and Biology of the Cell*, 13: 4279-4295.

Yu J & Thomson JA (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes and Development*, 22: 1987-1997.

*Capítulo IV*

**TRATAMENTO DE DEFEITOS CRÍTICOS  
PRODUZIDOS EM CALVÁRIA DE  
CAMUNDONGOS COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS**

*Manuscrito em preparação*

## TRATAMENTO DE DEFEITOS CRÍTICOS PRODUZIDOS EM CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS\*

MONTEIRO, Betânia Souza<sup>1</sup>; DEL CARLO, Ricardo Junqueira<sup>2□</sup>; ARGÔLO-NETO, Napoleão Martins<sup>1</sup>; NARDI, Nance Beyer<sup>3</sup>; VILORIA, Marlene Isabel Vargas<sup>4</sup>; CHAGASTELLE, Pedro César<sup>5</sup>; NEVES, Cinthya Dessaune<sup>1</sup>, BONFÁ, Laila de Paula<sup>1</sup>; FILGUEIRAS, Richard Rocha<sup>6</sup>; REIS, Amanda Maria Sena<sup>7</sup>.

### RESUMO

As células-tronco mesenquimais (MSC) estão presentes em nichos especializados nas regiões perivasculares dos tecidos adultos e são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, dentre eles, os comprometidos com processos de reparação óssea. No presente estudo foi avaliada a eficácia das MSC, oriundas da medula óssea de oito camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> e expandidas em culturas, na reparação de defeitos críticos produzidos em calvária de 24 camundongos isogênicos C57BL/6 jovens. Os animais foram submetidos a um defeito craniano de 6,0mm de diâmetro e separados em dois grupos experimentais iguais. O grupo controle não recebeu tratamento e no grupo tratado foi administrado, no interior do defeito, *pellet* de MSC contendo  $1,0 \times 10^7$  células/mL. Constatou-se que o transplante de células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> aplicadas em defeitos ósseos críticos produzidos em calvária de camundongos C57BL/6 jovens contribuiu positivamente para o processo de reparação óssea.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, reparação óssea, terapia celular.

---

\* Parte da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. (Apoio Financeiro CAPES, CNPq e FAPEMIG).

<sup>1</sup> Estudante de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT, UFV.

<sup>2</sup> Professor Titular, Pesquisador CNPq. DVT, UFV.

<sup>3</sup> Professora Titular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Professora Associada. DVT, UFV.

<sup>5</sup> Estudante de Pós-graduação em Imunogenética da UFRGS.

<sup>6</sup> Professor Adjunto. Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

<sup>7</sup> Estudante de graduação, UFV, bolsista de Iniciação Científica FAPEMIG.

□ Autor para correspondência: [ricarlo@ufv.br](mailto:ricarlo@ufv.br). Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are present in specialized niches in perivascular regions of adult tissues and are able to differentiate into various cell types, such as those committed with bone repairing. This study aimed to evaluate the efficacy of MSC from eight mice C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> bone marrows and expanded in culture, for repairing critical defects in calvarial bone produced in twenty-four young isogenic mice C57BL/6. The animals were subjected to a cranial defect of 6.0mm in diameter and divided into two equal experimental groups. Control group did not receive treatment and the treated group received a MSC pellet containing  $1.0 \times 10^7$  cells/mL into the defects. In these experimental conditions, it was found that transplantation of MSC derived from mice C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> bone marrow applied in bone critical defects produced in mice calvarial contributes positively to the bone repair process.

**Keywords:** mesenchymal stem cell, bone reparation, cell therapy.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell*, MSC) são células-tronco somáticas, presentes em nichos especializados nas regiões perivasculares dos tecidos adultos (Meirelles *et al.*, 2008; Caplan, 2009), capazes de se diferenciar em tecidos de origens mesenquimal, ectodermal e endodermal, como adiposo, ósseo, cartilaginoso, neural, entre outros (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999).

Esse tipo celular é rotineiramente isolado de diversos tecidos, destacando-se a medula óssea (MO), e amplamente expandido em culturas por meio de sucessivas mitoses. Em culturas, exibe propriedades como formato fibroblastóide, adesão em substrato plástico e capacidade de diferenciação (Nardi & Meirelles, 2006). Em acréscimo, pode ser expandido por mais de 40 gerações, mantendo sua capacidade de linhagem multipotente, embora com redução das taxas de crescimento (mitose), tornando desaconselhável o seu uso clínico após tantas passagens (Deans & Moseley, 2000).

Características como plasticidade, habilidade de expansão e a possibilidade de serem vetores para genes terapêuticos tornam esse grupo celular alvo de interesse na medicina regenerativa (Deans & Moseley, 2000; Muraki *et al.*, 2006).

Alguns estudos *in vitro* têm ilustrado a participação direta e indireta das MSC na homeostase óssea. Elas atuam como fonte progenitora de osteoblastos, via diferenciação celular, além de regular a osteoclastogênese, via a expressão de RANKL (receptor ativador do fator  $\kappa$ B nuclear), e OPG (osteoprotegerina) [Bielby *et al.*, 2007]. Em adição, o contato célula-célula determina a produção de diferentes fatores de crescimento solúveis incluindo G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos), M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), que influenciam as demais células osteocomprometidas indiferenciadas e jovens e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (Deans & Moseley, 2000; Bobis *et al.*, 2006).

Em processos de reparação de fraturas, a formação óssea providenciada pelas MSC acontece tanto por ossificação intramembranosa quanto endocondral. A formação intramembranosa requer o recrutamento de MSC presentes principalmente no periósteo, seguido de diferenciação osteogênica e formação óssea sem a existência prévia de tecido cartilaginoso; enquanto a endocondral, que pode ocorrer paralelamente ao processo intramembranoso, necessita de células condroprogenitoras para estabelecer a formação do calo, que é seguida pela invasão de novos vasos sanguíneos e tipos celulares capazes de remodelá-lo em tecido ósseo (Zhang *et al.*, 2005; Bielby *et al.*, 2007). O diferencial, nesses processos, é que as MSC além da capacidade de influenciar o correto funcionamento de osteoblastos, incrementam a quantidade de células mobilizadas e aumentam a velocidade do crescimento e deposição de matriz óssea (Horwitz *et al.*, 1999).

No presente estudo foi avaliado o emprego das células-tronco mesenquimais (MSC), oriundas da medula óssea e expandidas em culturas, na reparação óssea de defeitos críticos produzidos em calvária de camundongos isogênicos C57BL/6 jovens.

A calvária, porção fronto-parietal do crânio, é região que apresenta limitada capacidade de reparação, prestando-se como modelo experimental para pesquisas que

investigam a necessidade de incrementar as etapas de reparação com tipos celulares capazes de aumentar a velocidade do crescimento e deposição óssea.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado em março/2007, sob parecer número 46/2007, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

**Animais de experimentação:** foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem C57BL/6 isogênicos, com peso corpóreo médio de 30,0 gramas, seis meses de idade. Oito camundongos foram utilizados no estudo *in vitro*, como doadores de medula óssea e 24 utilizados no estudo *in vivo*. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas<sup>8</sup> de 0,15m<sup>2</sup>, sob fotoperíodo de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, ruídos mínimos, alimentados com ração sólida<sup>9</sup> e água *ad libitum*.

**Cultura de células-tronco mesenquimais:** as células da cultura primária foram coletadas da medula óssea de oito camundongos C57BL/6 transgênicos para o gene repórter *gfp* (green protein fluorescence, proteína verde fluorescente) e depositadas em placa de crescimento de cultura celular<sup>10</sup> com meio de cultura<sup>11</sup> e mantidas em estufa incubadora<sup>12</sup> à 37° C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%. Quando o crescimento celular apresentava aproximadamente 80% de células confluentes, foi realizada a tripsinização, contagem e repique destas células para garrafas de cultura<sup>13</sup> de 25,0cm<sup>2</sup>.

**Expansão da cultura primária:** o meio de cultura<sup>14</sup> da garrafa<sup>15</sup> foi totalmente retirado e as garrafas de cultura foram lavadas com 3,0mL de solução fosfato salina tamponante (PBS 1x, pH 7,2). Em seguida, as células aderidas ao fundo da garrafa foram tripsinizadas com solução de tripsina 0,25%<sup>16</sup> e incubadas<sup>17</sup> à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e

<sup>8</sup> Gaiolas para roedores SEALS SAFE™ – Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>9</sup> Ração para animais de laboratório, 23%PB, LABINA® PURINA do Brasil, Paulínia, SP, Brasil.

<sup>10</sup> Placa de crescimento celular de seis poços TPP, Trasadingen, Switzerland.

<sup>11</sup> Meio para cultura celular DMEM. SIGMA Chemycal Co., St. Louis, MO, USA.

<sup>12</sup> Incubadora V ELP® – Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>13</sup> Garrafa para cultivo de tecidos, poliestireno estéril – Cultilab, Campinas, SP, Brasil

<sup>14</sup> Meio para cultura celular DMEM. SIGMA Chemycal Co., St. Louis, MO, USA.

<sup>15</sup> Garrafa para cultura de tecidos - CULTILAB®, Campinas, SP, Brasil.

<sup>16</sup> Solução de Tripsina-EDTA 1x, frasco com 100 mL. SIGMA Chemycal Co., St. Louis, MO, USA

umidade de 95%, durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 5,0mL de meio completo e a suspensão contendo as MSC foi transferida para tubos de centrífuga<sup>18</sup> e centrifugadas<sup>19</sup> à temperatura de 22°C e 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o *pellet* foi ressuspendido em tubos de centrífuga contendo 1,0mL de PBS 1x.

Uma alíquota de 10,0µL desta solução foi diluída em 10,0µL de corante Azul de Tripán e homogeneizada num frasco de vidro esterilizado. Esta solução foi utilizada contagem celular em câmara de Neubauer, conforme o preconizado por Meirelles & Nardi (2003) e Bittencourt *et al.*(2006).

Quando obtida a concentração celular mínima de  $1,0 \times 10^7$  células/mL (Meirelles & Nardi, 2003) os tubos contendo as MSC foram novamente centrifugados, em temperatura de 22°C e 1500rpm por 10 minutos, acondicionados em caixa térmica e transportados para o centro cirúrgico do Hospital Veterinário da UFV, visando o transplante imediato nos camundongos C57BL/6 isogênicos. No momento da aplicação o sobrenadante foi desprezado e apenas o *pellet* foi utilizado.

Quando a concentração celular não era obtida, a suspensão foi diluída em 5,0mL de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), e transferida para nova garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>, mantida em estufa incubadora à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%, por sete dias, até a reavaliação da concentração celular.

**Experimentação *in vivo*:** os 24 animais foram separados em dois grupos experimentais iguais, grupos controle (GC) e MSC (GM), por meio de sorteio. Todos foram submetidos ao mesmo nível de estresse quanto à manipulação e os grupos experimentais foram conduzidos ao mesmo tempo.

Antecedendo ao ato cirúrgico, os camundongos receberam antibioticoterapia profilática com enrofloxacina (10,0mg/kg, IM), e medicação analgésica à base de morfina (5,0mg/kg, SC), que perdurou por três dias e a cada 8 horas, visando o controle da dor.

---

<sup>17</sup> Incubadora VELP®, Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>18</sup> Tubo de centrífuga tipo Falcon com capacidade de 15mL - ACQuímica – Paulínia, SP - Brasil.

<sup>19</sup> Citocentrífuga de bancada CT12 PRESVAC®, Presvac, Itajaí, SC, Brasil.

Os camundongos foram submetidos à medicação pré-anestésica com xilazina (5,0mg/kg, IP) e indução e manutenção com anestésico inalatório<sup>20</sup>, em câmara de anestesia. Em seguida foram contidos em decúbito ventral, tricotomizados na porção dorsal do crânio, submetidos a anti-sepsia da área tricotomizada com solução povidine-iodine e tiveram o campo operatório delimitado por pano esterilizado.

A pele, subcutâneo e musculatura foram incisados sobre a crista sagital externa do crânio, desde a protuberância occipital até próximo aos olhos, aproximadamente 1,0cm de comprimento, permitindo a exposição do osso parietal. Com auxílio de uma broca<sup>21</sup> de 6,0mm de diâmetro externo, conectada a uma perfuratriz elétrica<sup>22</sup>, na velocidade de 5000rpm e sob irrigação contínua com solução fisiológica, foi realizada um defeito na região parietal, com área aproximada de 28,3mm<sup>2</sup>, transpassando toda espessura da diploe, com exposição das meninges, que foi mantida íntegra no fundo do defeito.

O grupo MSC teve o defeito preenchido com o *pellet* contendo 1,0 x 10<sup>7</sup> células/mL e o grupo controle não recebeu tratamento. Em ambos os grupos foi colocada uma membrana cortical desmineralizada reabsorvível<sup>23</sup>, com extensão de 0,7 x 0,7cm, acima do defeito e abaixo da pele. Posteriormente, a pele foi aproximada com fio monofilamentar não-absorvível<sup>24</sup>, em pontos simples-separados. Todos os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia, durante todo o período experimental e avaliados quanto ao peso, comportamento e consumo de alimento e água.

**Períodos de avaliações:** três animais de cada grupo foram identificados, pesados e submetidos à eutanásia, por sobredosagem anestésica com tiopental sódico, nos dias 10, 30, 60 e 90 de pós-operatório. Em seguida, cada camundongo foi contido em mesa cirúrgica para coleta de biópsias óssea, envolvendo a região do defeito e a porção lateral do osso receptor. O fragmento foi identificado, medido, fotografado e conservado em formaldeído a 10% tamponado para posterior processamento histológico e realização de reação em cadeia da polimerase.

---

<sup>20</sup> Isoflurano, AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil.

<sup>21</sup> Broca trefina cirúrgica – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>22</sup> Microrretífica Dremel – Bosch, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>23</sup> Genderm – Membrana biológica de origem bovina – Genius, Baumer, SP, Brasil.

<sup>24</sup> Nylon 2-0 – Brasuture, São Sebastião da Grama, SP, Brasil.

**Avaliação macroscópica:** consistiu na mensuração da área do defeito e estabelecimento do percentual de reparação óssea (área inicial - área mensurada em cada período/área inicial) em milímetros (mm), por meio de análise de fotografias digitais obtidas com escala de mensuração (régua/escalímetro), intensidade de luz e altura da máquina fotográfica digital<sup>25</sup> constantes. As imagens digitais foram transferidas a um computador<sup>26</sup> e analisadas por um programa específico<sup>27</sup>. O local e aspecto do defeito e a presença de crescimento ósseo também foram registrados.

**Análise estatística:** A análise estatística foi realizada com auxílio de software específico<sup>28</sup> e da planilha eletrônica Excel<sup>®</sup>. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de Kolmogorov–Smirnov para verificação da distribuição de normalidade da variável percentual de reparação óssea. Foi estabelecida a média do percentual de reparação óssea em cada período avaliado e foi realizada a análise das amostras independentes mediante a aplicação do Teste t de Student. Para tanto, foi adotado um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (Ribeiro-Júnior & Melo, 2009).

**Avaliação microscópica:** o material coletado foi submetido a processamento histológico de rotina, incluído em parafina e cortado (5,0 $\mu$ m de espessura) em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio, envolvendo toda a área do defeito e bordas do osso receptor (corte longitudinais) e, posteriormente, foi corado por Hematoxilina e Eosina (H&E). As amostras foram avaliadas quanto à presença e características do tecido de preenchimento, por meio de análise histológica descritiva.

**Extração de DNA:** foi realizada a extração de DNA genômico das células MSC *gfp*<sup>+</sup> mantidas em cultura, de tecido ósseo fresco de animais *gfp*<sup>-</sup> (controle negativo) e de uma amostra parafinizada contendo o tecido ósseo da região do defeito e transplante celular, conforme o protocolo do kit<sup>29</sup>. As amostras incluídas em parafina foram desparafinizadas e reidratadas previamente às etapas de extração de DNA, segundo protocolo descrito por Nascimento *et al.* (2003).

---

<sup>25</sup> Sony cybershot<sup>®</sup> 10.1 megapixels, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>26</sup> Notebook ACER, PentiumCeleron<sup>®</sup> processador 550, 2.0 Ghz, 533 MHz, 1 MB, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>27</sup> Software de análise de imagens IMAGELAB PRÓ PLUS<sup>®</sup>, Média Cybernetics, Bethesda, MD, USA

<sup>28</sup> Sistema para Análises Estatísticas<sup>®</sup> SAEG v. 9.1, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>29</sup> QIAamp DNA Mini Kit (250), QIAGEN, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil.

**Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** a PCR foi realizada visando a amplificação de um fragmento de 225 pares de base (bp) do gene *gfp* utilizando os *primers*: *GFP-5C* 5' ACT TCA AGA TCC GCC ACA ACA T 3' (direto) e *GFP-3C* 5' TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC 3' (reverso) [Coura, comunicação pessoal]<sup>30</sup>, com o objetivo de verificar a presença do gene *gfp* nas amostras de tecido. A reação foi desenvolvida em um volume final de 25,0µL contendo os seguintes reagentes: 7,0µL de DNA da amostra; 2,5µL do *primer GFP-5C* a 0,02mM; 2,5µL do *primer GFP-3C* a 0,02mM; 2,5µL de cada dNTP a 2,0mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 2,5µL de tampão da Taq DNA polimerase 1x e 1U de Taq DNA polimerase<sup>31</sup>. A PCR foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por ciclos de três etapas: desnaturação a 94°C por 35 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72° por 1 minuto, num total de 40 ciclos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados em solução de brometo de etídeo para visualização em transluminador.

## RESULTADOS

Na inspeção diária, durante todo o período pós-operatório, não foram observadas perdas de peso, apatia, sinais de infecção ou de lesões neurológicas nos animais do estudo.

Na avaliação macroscópica, independentemente do grupo experimental, não foi observado crescimento ósseo fora das margens receptoras e nem abaixo da meninge. Também foi constatada ausência de fechamento total dos defeitos até o período final de avaliação e de aderências entre cérebro, meninges e tecidos de reparação.

Observou-se, tanto em GC quanto em GM, que o osso novo de preenchimento do defeito apresentava espessura inferior ao osso receptor circunvizinho e que ao longo dos períodos de avaliações, as bordas perdiam suas características de perímetros circulares, tornando-se irregulares, nos locais de maior preenchimento.

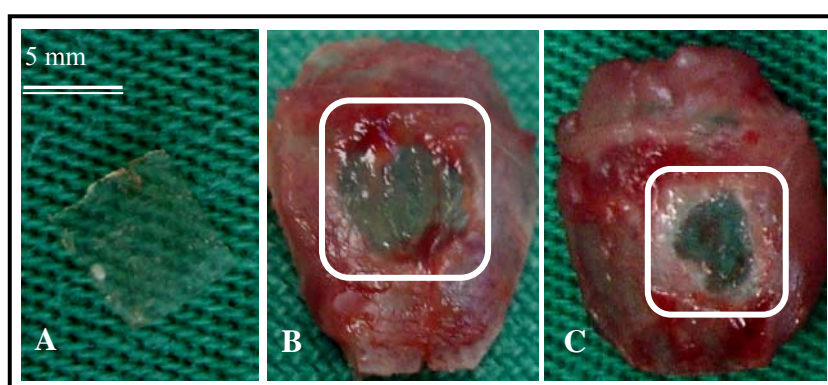
---

<sup>30</sup> Coura, R. Comunicação pessoal. Porto Alegre, RS. UFRGS. Março de 2009.

<sup>31</sup> Taq DNA polimerase, Invitrogen Co, Carlsbad, CA – USA.

A membrana desmineralizada depositada acima de todos os defeitos (Fig. 1A) ainda estava presente em dois animais do GC, aos 10 dias de avaliação, e não estava presente no GM. Essa membrana não foi observada nos demais períodos.

Ainda, macroscopicamente, foi observado, nos animais de ambos os grupos, um tecido transparente e delgado, cobrindo o defeito, com aparência de tecido cicatricial, acima da área ainda não reparada com tecido ósseo (Fig. 1B e 1C). Apenas em dois animais do GC, um avaliado aos 10 e outro aos 30 dias esta cobertura não estava completa.



**Figura 1** – Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório. A) Membrana transparente. B) Região parietal do crânio de camundongo do grupo controle. C) Região parietal do crânio de camundongo do grupo MSC. Em B e C, destaque para a área do defeito ósseo, com bordas irregulares e o tecido transparente e delgado recobrimo a falha.

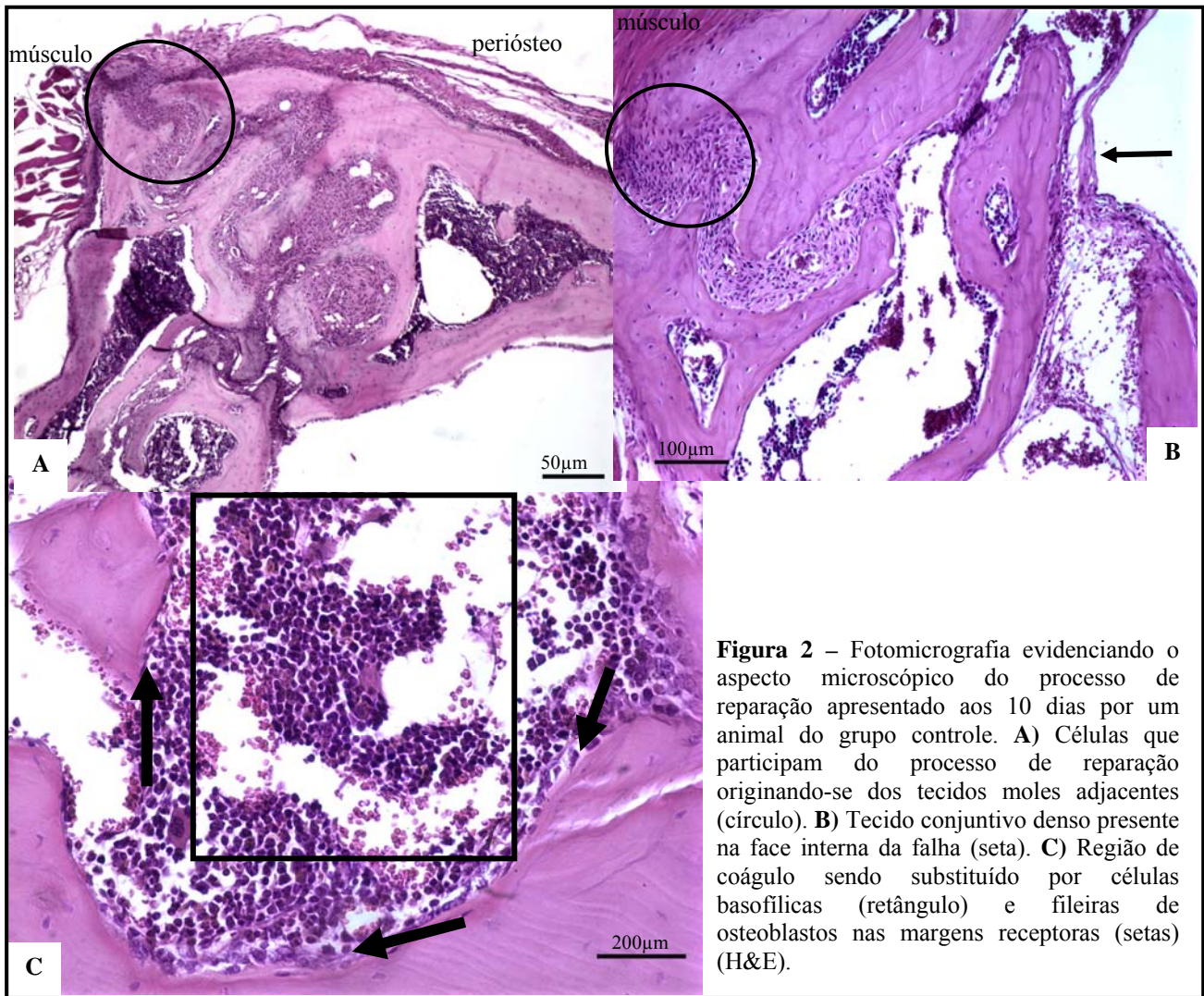
Por meio da análise da variável percentual de reparação óssea verificou-se diferença ( $p = 0$ ) entre os dois grupos experimentais em todos os períodos de avaliação e que os animais do GM apresentaram os melhores valores de reparação. Os valores desse percentual no GM, aos 10 dias, só foram observados no GC após o período de 30 dias. Ainda no GM, o percentual de reparação ocorrido do dia inicial da lesão até os 10 primeiros dias foi o maior encontrado (56%), e foi diminuindo ao longo dos dias (dia 11 ao 30, 6%; dia 31 ao 60, 3%; dia 61 ao 90, 5%). No GC o maior percentual foi verificado entre os dias 11 e 30 (30%) e o valor observado aos 90 dias foi semelhante ao exibido aos 30 dias no grupo tratado pelas células-tronco mesenquimais. A tabela 1 apresenta os valores do percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais agrupados nos grupos controle e tratado com MSC e os valores de  $p$  oriundos do estudo estatístico.

**Tabela 1** - Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com MSC (Tratamento 1= grupo controle. Tratamento 2 = grupo MSC) e os valores de  $p$  calculados confrontando dados da % de preenchimento ósseo, por período, do tratamento 2 *versus* tratamento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Período (dias)</b>	<b>Médias das áreas (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Percentual de reparação óssea (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Valor de <math>p</math> calculado</b>
GC	10	22,133	21,880	$p = 0,0000$
GM	10	12,480	55,951	
GC	30	13,863	51,069	$p = 0,0000$
GM	30	10,844	61,725	
GC	60	11,843	58,199	$p = 0,0000$
GM	60	10,054	64,514	
GC	90	10,495	62,957	$p = 0,0000$
GM	90	8,458	70,147	

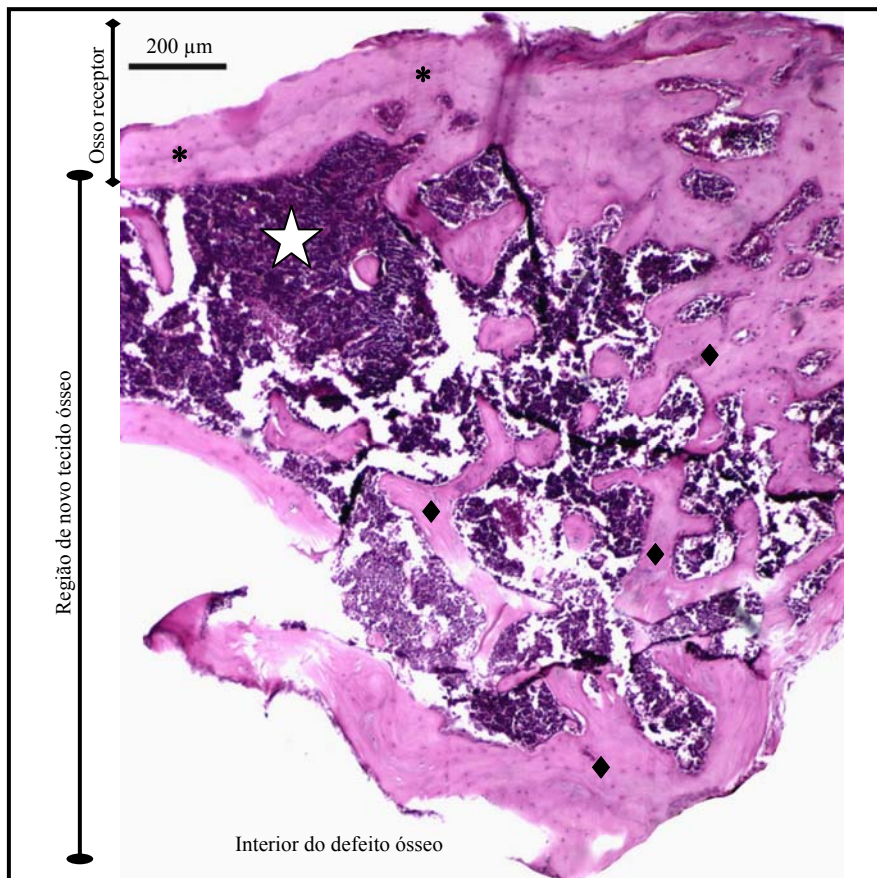
Os exames realizados sob microscopia de luz revelaram que o tecido transparente e delgado, que recobria os defeitos em GC e GM, estava constituído de tecido conjuntivo denso com diferentes graus de celularidade e não continha células inflamatórias.

No **grupo controle**, aos 10 dias, observou-se multiplicação celular com discreta formação óssea nas bordas do defeito e em direção ao centro. Foi verificada a presença de infiltrado de células basofílicas, substituindo a região anteriormente ocupada pelo coágulo sanguíneo. A maioria das células que participavam do processo de reparação originaram-se, principalmente, dos tecidos moles (periósteo e musculatura) presentes nas extremidades do defeito (Fig. 2).



**Figura 2** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle. **A)** Células que participam do processo de reparação originando-se dos tecidos moles adjacentes (círculo). **B)** Tecido conjuntivo denso presente na face interna da falha (seta). **C)** Região de coágulo sendo substituído por células basofílicas (retângulo) e fileiras de osteoblastos nas margens receptoras (setas) (H&E).

Aos 30 dias, em algumas amostras, percebeu-se maior formação óssea em comparação ao período anterior, com o novo tecido dispondo-se em ilhas circundadas por tecido de granulação e insinuando-se para o interior de defeito (Fig. 3). Nesse momento, os vasos sanguíneos de permeio ao tecido de granulação estavam presentes em quantidade superior à observada aos 10 dias.



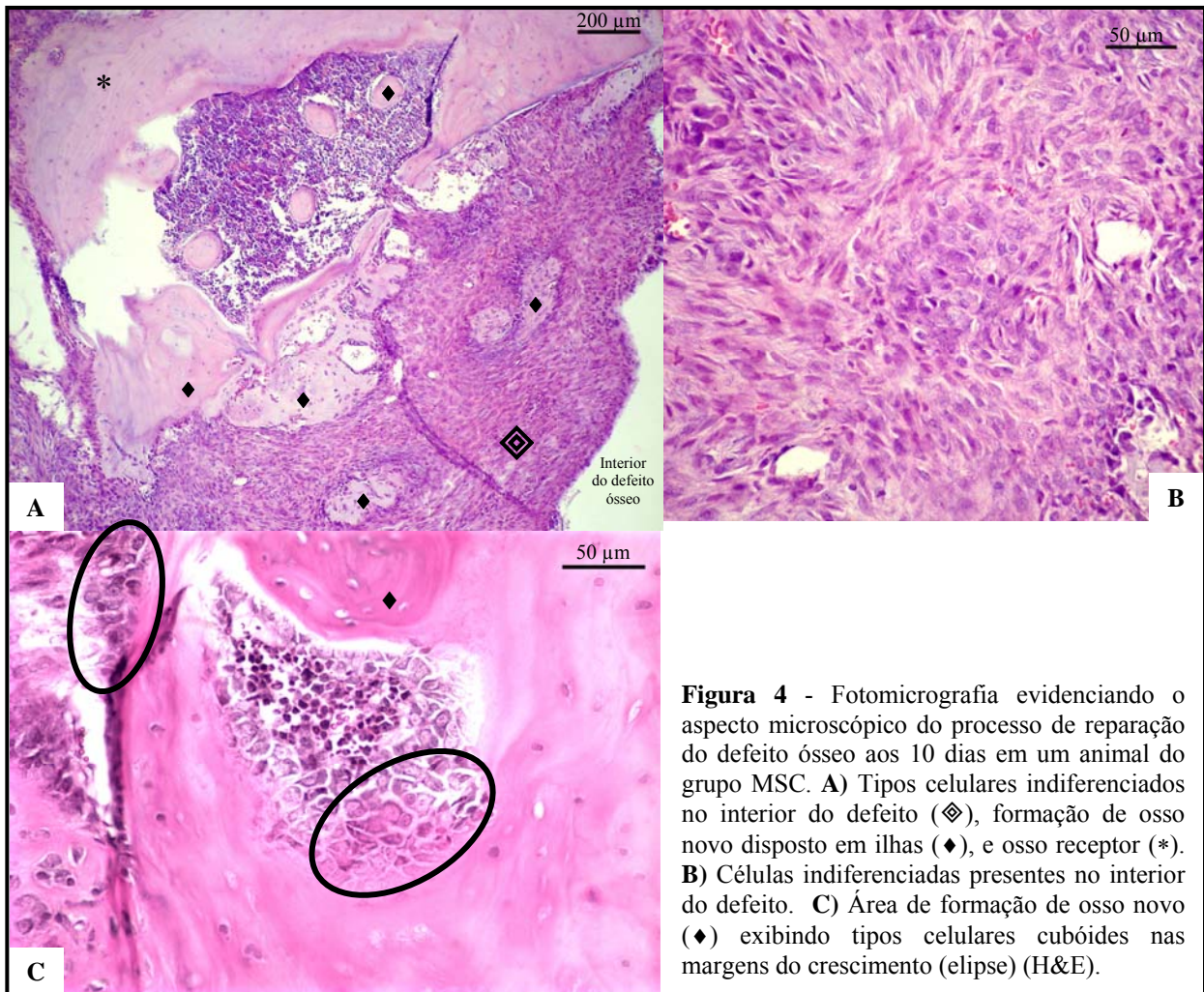
**Figura 3** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle. Região de reparação com formação de novo tecido ósseo (◆), rodeado por células basofílicas (☆) e se insinuando para o interior da falha a partir do osso do receptor (\*) (H&E).

Aos 60 e 90 dias o crescimento ósseo foi progressivo em relação ao tempo de observação, com presença de medula óssea com células mononucleares entremeando a díploe óssea. Foi visualizada presença de células grandes, arredondadas, com citoplasma eosinofílico e núcleo basofílico sugestivas de megacariócitos.

No **grupo MSC (GM)** observou-se maior angiogênese e quantidade de novo tecido ósseo depositado nas margens do defeito que as observadas no GC. A quantidade de novos vasos foi superior aos 10 dias quando comparado aos demais períodos no mesmo grupo. Também foi visualizado, em alguns espécimes, infiltrado celular constituído de células basofílicas substituindo a região anteriormente ocupada pelo

coágulo sanguíneo. Já no GC, a substituição por tecido de granulação foi observada em todas as amostras e em vários pontos de observação.

Aos 10 dias, observou-se intensa movimentação celular oriunda dos tecidos moles presentes na periferia do defeito e presença de tipos celulares indiferenciados, com morfologia cubóide e núcleos arredondados, ocupando o interior do defeito e em contato com as margens receptoras (Fig. 4A e 4B). Na região central estavam evidentes ilhas ósseas com pequenos graus de organização tecidual e deposição de tipos celulares cubóides, diferenciados em células ósseas, nas margens do crescimento (Fig. 4C)

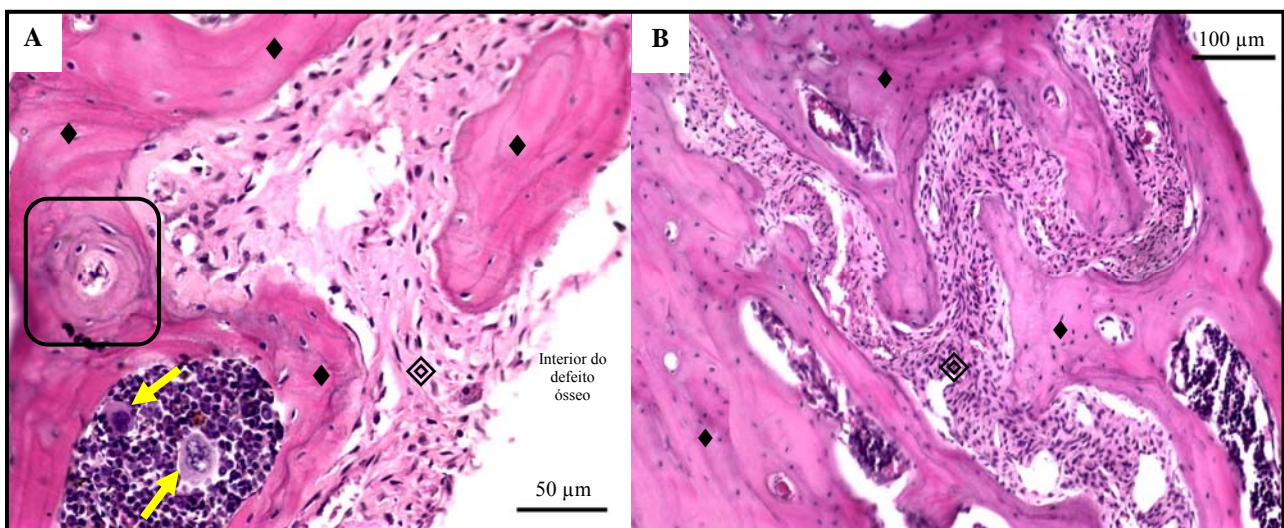


Aos 30 dias, observou-se maior crescimento de tecido ósseo, originando-se na periferia e progredindo em direção ao centro do defeito, com pequeno grau de organização e exibindo presença de células indiferenciadas fibroblastóides se organizando entre as novas formações.

Aos 60 dias, evidenciou-se maior quantidade de tecido ósseo e de maior organização que até então observada. Também estavam presentes células indiferenciadas fibroblastóides e células jovens cubóides próximas ao osso novo formado (Fig. 5A).

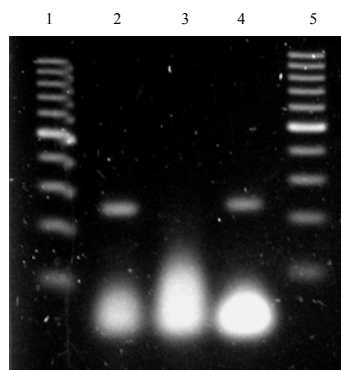
Os aspectos histológicos observados aos 90 dias foram similares aos relatados nos períodos anteriores, destacando-se maior formação óssea e organização do tecido osteóide. A quantidade e o amadurecimento do osso formado progrediram concomitantemente com o avançar do tempo de observação (Fig. 5B).

No GM evidenciaram-se maior quantidade de osteoblastos e tecido osteóide se organizando quando comparado ao GC e independentemente do tempo de análise, observou-se osteoblastos cubóides em intensa atividade de deposição de matriz óssea, se enfileirando nas margens da nova formação tecidual. Com a progressão do período de avaliação, foram visualizados discretos focos com sinais de remodelação óssea e/ou presença de osteoclastos.



**Figura 5** - Fotomicrografias evidenciando o aspecto microscópico de uma região de formação de novo tecido ósseo em animais do grupo MSC. **A)** 60 dias. Presença de células indiferenciadas, fibroblastóides, (◇) de permeio a novas formações ósseas (◆), osteon com vaso sanguíneo central (retângulo). Vaso sanguíneo calibroso, contendo células basofílicas e células arredondadas de núcleo basofílico e citoplasma acidófilo, sugestivas de megacariócitos (setas). **B)** 90 dias. Presença de osso novo em formação (◆), células indiferenciadas fibroblastóides de permeio as novas formações ósseas (◇) (H&E).

A amostra derivada do tecido que foi tratado com MSC apresentou o fragmento de DNA amplificado conforme tamanho esperado e exibiu a marcação de banda em gel de agarose 1,5% (Fig. 6). O seqüenciamento dos produtos da PCR ainda está sendo aguardados.



**Figura 6** – Fotografia do gel de agarose exibindo o bandeamento das amostras submetidas a PCR. Canaleta 1 e 5 contendo marcador padrão de 100 pares de base. Canaleta 2 contendo produto da PCR das células em cultura (controle positivo). Canaleta 3 contendo produto da PCR da amostra de tecido ósseo de animal *gfp*<sup>-</sup> (controle negativo). Canaleta 4 contendo produto da PCR da amostra de tecido ósseo parafinizado de um animal tratado com MSC/*gfp*<sup>+</sup>.

## DISCUSSÃO

As características específicas das células-tronco mesenquimais (MSC), incluindo seu potencial proliferativo e a habilidade de se diferenciar em diversos tipos de células e tecidos, como ósseo, adiposo e cartilaginoso, tornaram-nas uma ferramenta atrativa para a medicina regenerativa (Deans & Moseley, 2000; Muraki *et al.*, 2006). Devido a isso, atualmente, em áreas como biologia celular, terapias reconstrutiva e genética, é considerável o aumento do número de pesquisas, discussões e ensaios clínicos com base na aplicação de MSC.

No presente estudo foram utilizadas células oriundas de camundongos isogênicos, portanto, foram implantadas células autógenas. Todavia, diversos autores sugerem também o transplante de MSC alogênicas, chamadas de “células-universais”, em terapias celulares. A base científica para tal sugestão deve-se as demonstrações de que essas células indiferenciadas adultas não expressam marcadores de superfície do tipo MHC-II (complexo de histocompatibilidade principal) e moléculas co-estimulatórias do tipo B7-1 e B7-2; CD-40 e CD-40L e, expressam pequenos níveis de

MHC-I. Esses fatores influenciariam a interação desse tipo celular indiferenciado com células do sistema imune, como linfócitos T, B, NK (natural killer) e células dendríticas, proporcionando imunossupressão, e em alguns casos, provocariam até a apoptose das mesmas (Aggarwal & Pittenger, 2005; Patel *et al.*, 2008; Caplan, 2009).

Ademais, considerando-se que os processos de cicatrização são complexos e que necessitam de interações entre o local danificado e as células reparadoras, espera-se que, nestas circunstâncias, as MSC incrementem esses processos por também liberarem diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis incluindo G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos), M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), capazes de ativar diferentes tipos celulares, incluindo células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação (Deans & Moseley, 2000; Bobis *et al.*, 2006).

No GM foi visualizada, no período inicial de avaliação, uma marcante presença de infiltrado celular constituído por células basofílicas e com base em afirmações prévias (Deans & Moseley, 2000; Bobis *et al.*, 2006) é possível inferir que essas células possam ter sofrido influência quimiotática dos fatores solúveis liberados no meio, explicando essa presença em maior quantidade. Para Honma *et al.* (2008), o processo inflamatório desencadeado pelo procedimento cirúrgico pode ter iniciado e mantido a diferenciação das MSC em osteoblastos. De forma análoga, Lacey *et al.* (2009) demonstraram o potencial de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), influenciando positivamente o potencial osteogênico por favorecer a produção de osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do fator  $\kappa$ B nuclear (RANKL), duas citocinas que atuam nos processos de deposição e reabsorção óssea. Vale lembrar também que a fase inflamatória é fundamental num processo de reparação, pois acarreta ativação e diferenciação de células osteoprogenitoras e ativação de células ósseas jovens.

O tratamento dos defeitos utilizando as MSC revelou maior formação óssea em relação ao grupo controle, contudo, mesmo ao final do período de avaliação aos 90 dias, em ambos os grupos, os defeitos não estavam totalmente preenchidos. Esta característica permite reconhecer que foi criado um defeito crítico na calvária do

camundongo, com diâmetro de 6,0mm. Além disso, corroboram dados da literatura que afirmam que nesta espécie animal são considerados críticos os defeitos cujos diâmetros são superiores a 2,7mm (Seo *et al.*,2008). Conseqüentemente, por mais que o tratamento com as células indiferenciadas tenha incrementado o processo de reparação, ele não foi suficiente para contribuir com a total reparação. Ademais, sabe-se que a reparação de defeitos ósseos em crânio ainda representa um grande desafio para a ortopedia devido à pequena capacidade reparadora dessa região (Del Carlo *et al*, 1994; Monteiro *et al*, 2007).

Seo *et al.* (2008) utilizaram células-tronco retiradas de dentes decíduos de humanos (SHED – stem cells from human exfoliated deciduous teeth) na reparação de defeitos críticos em calvária de camundongos imunocomprometidos e obtiveram total reparação do defeito ósseo. Contudo, diferentemente do apresentado no atual trabalho, os autores relatados criaram defeitos de 2,7mm e avaliaram os pacientes ao final de 6 meses. Portanto, equivalendo ao limite do defeito crítico, menos da metade do tamanho do defeito realizado nesta pesquisa e avaliaram pelo dobro do tempo.

O estudo estatístico confirmou que o tratamento com MSC incrementou o processo de reparação óssea e acarretou o crescimento de maior quantidade de novo osso, sobretudo nos 10 primeiros dias após o tratamento, fase mais precoce. Ademais, permitiu verificar que a maior taxa de reparação óssea exibida no grupo controle aos 90 dias foi semelhante à taxa do grupo tratado aos 30 dias.

A membrana cortical desmineralizada reabsorvível, utilizada acima dos defeitos em ambos os grupo, teve a finalidade de evitar a dispersão do material depositado no interior da lesão uma vez que o camundongo não possui musculatura e tecido subcutâneo, nessa região da calvária, em quantidade suficiente para serem suturadas e impedir o extravasamento das células que foram utilizadas no tratamento. Na avaliação realizada aos 30 dias em ambos os grupos, ela não estava mais presente concordando com os dados do estudo piloto preliminar, realizado pelos autores, que constatou que ela não influencia o processo de reparação óssea, sendo totalmente reabsorvida num período de 15 dias.

De acordo com Martin (1997) e Tsirogianni *et al.* (2006), num processo de reparação tecidual, a primeira fase envolve a formação e organização do coágulo

sangüíneo durante as 24 horas iniciais. Após esse período, o coágulo começa a ser substituído e, por volta do nono a décimo primeiro dia está completa a substituição por tecido de granulação. No GM o infiltrado celular constituído de células basofílicas substituindo a região anteriormente ocupada pelo coágulo sanguíneo foi visualizado apenas em alguns espécimes, ao contrário de GC, onde essa substituição foi observada em todas as amostras e em vários pontos de observação. Possivelmente, no GM, a presença de maior quantidade de células disponíveis no local da reparação pode ter antecipado essa substituição do coágulo.

No primeiro período de avaliação, aos 10 dias, foi observada no GM a presença de grande quantidade de células indiferenciadas de morfologia ora cubóide ora fibroblástóide, no interior do defeito, participando da formação do novo tecido ósseo. Este evento não foi visto no GC possivelmente porque as células observadas foram as MSC empregadas no tratamento e/ou células indiferenciadas quimioatraídas pelos fatores solúveis liberados no meio. Aos 30, 60 e 90 dias também foram visualizadas células indiferenciadas fibroblástóides de permeio aos novos crescimentos ósseos, contudo a morfologia era diferente das células observadas aos 10 dias. Possivelmente, aos 10 dias, as células presentes eram as transplantadas e aos 30, 60 e 90 dias as células indiferenciadas eram as que foram atraídas para o local de reparação.

Na avaliação microscópica, outro achado foi uma intensa celularidade oriunda dos tecidos moles presentes na periferia do defeito e migrando de forma centrípeta, principalmente no GM, demonstrando a contribuição das células ósseas presentes no perióstio para o processo de reparação. Shimizu *et al.* (2001) já haviam demonstrado que dentre as células que constituem a reparação, no perióstio existem as progenitoras com potencial de se diferenciar em osteoblastos, que são ativadas por estimulação física ou química, como nos casos de fraturas, inflamações e desenvolvimento de tumores, e que contribuem para os processos de reparação. Com o mesmo intuito, Zhang *et al.* (2005) afirmaram que além da função de proliferação e diferenciação em células cartilaginosas e ósseas, as células mesenquimais progenitoras, que estão presentes no perióstio, também liberam fatores osteoindutores capazes de recrutar e ativar as demais células osteocomprometidas do hospedeiro.

No GM foi observada maior angiogênese e formação óssea em relação ao GC. A maior formação óssea reflete a presença de maior quantidade de osteoblastos, que

podem ter-se originado por diferentes mecanismos de diferenciação das células precursoras mesenquimais (Herzog *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2006) e/ou terem sido atraídas para o local do defeito por efeito parácrino (Moore & Quesenberry, 2003). Uma vez presente nas margens da lesão, essas células osteogênicas secretam matriz protéica óssea, incluindo colágeno tipo I e proteoglicanos e estimulam a mineralização e formação do tecido osteóide (Shen *et al.*, 2005; Bobis *et al.*, 2006).

Em relação à formação óssea, os tipos celulares presentes em ambos os grupos foram os mesmos. Observou-se osteoblastos cubóides, dispostos em fileiras nas bordas da nova formação óssea e discreta presença de osteoclastos próximos aos novos vasos sanguíneos que se formavam. A diferença entre os grupos foi a quantidade de células de deposição óssea, maior no GM.

Ao se avaliar as contribuições das terapias reparativas com MSC é imprescindível considerar a característica do local onde as células serão depositadas. De acordo com Fuchs *et al.* (2004), o sucesso terapêutico é dependente do nicho, ou seja, as interações das células-tronco com as demais células, com a matriz extracelular (MEC) e com os fatores de crescimento do meio, que manterão essas células quiescentes e/ou em processos de diferenciação. Dessa forma, a criação das feridas de forma cirúrgica e asséptica e a aplicação das células num momento agudo do processo de lesão (janela terapêutica), conforme o realizado, favoreceram a manutenção, diferenciação e liberação de demais fatores solúveis por parte das MSC, contribuindo para a formação superior de tecido ósseo no GM.

A presença de banda no gel de agarose detectada no animal tratado, similar à verificada no controle positivo (próximo à 225 pb) comprova a presença do gene repórter nos animais tratados com MSC *gfp*<sup>+</sup> e nos permite inferir que as células-tronco utilizadas no tratamento permaneceram presentes no processo de reparação óssea.

## CONCLUSÃO

Sob as condições nas quais foi desenvolvido o experimento, constata-se por meio das avaliações macroscópicas, estatísticas, microscópicas e moleculares que o emprego das células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> aplicadas em defeitos ósseos críticos produzidos em

calvária de camundongos C57BL/6 jovens contribui positivamente para o processo de reparação óssea.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro; à equipe do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, às equipes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários e Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores da Universidade Federal de Viçosa pelo suporte técnico.

## **REFERÊNCIAS**

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allergenic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury International Journal of the Care of the Injured**, v. 38S1, p. S26-S32, 2007.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L. et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.1, p.22-24, 2006.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopedics Research**, v.9, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p. 318-324, 2009.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potencial clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p. 875-884, 2000.

DEL CARLO, R.J.; IAMAGUTI, P.; BRANCO, M.D.L. et al. Cranioplastia por interposição de auto-enxerto costal. III. Aspectos da enxertia óssea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, p. 244-252, 1994.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, p.769–778, 2004.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.

HONMA, T.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA, M. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Diseases**, v.14, p. 457-464, 2008.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; FITZPATRICK, L.A. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v.5, p. 309–313, 1999.

LACEY, D.C.; SIMMONS, P.J.; GRAVES, S.E. et al., Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation, **Osteoarthritis and Cartilage**, 2009. doi:10.1016/j.joca.2008.11.011.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, v.123, p.702-711, 2003.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, n.119, p.2204-2213, 2006.

MEIRELLES, L.S; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p. 2287-2299, 2008.

MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, R.J; PINHEIRO, L.C.P. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.745-751, 2007.

MOORE, B.E.; QUESENBERRY, P.J. The adult hemopoietic stem cell plasticity debate: idols vs new paradigms. **Leukemia**, v.17, p. 1205-1210, 2003.

MURAKI, K.; HIROSE, M.; KOTOBUKI, N. et al. Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 1711-1719, 2006.

NARDI, N.B; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p.249-282, 2006.

NASCIMENTO, E.M; SPINELLI, M.O; RODRIGUES, C.J. et al. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Rio de Janeiro**, v. 39, p. 253-255, 2003.

PATEL, S.A.; SHERMAN, L.; MUNOZ, J. et al. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Archivum immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2008.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p. 143-147, 1999.

RIBEIRO-JÚNIOR, J.I; MELO, A.L.P. Guia prático para a utilização do SAEG. Viçosa: Folhas Artes Gráficas. 2009.288p.

SEO, B.M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v.14, p. 428-434, 2008.

SHEN, F.; RUDDY, M.J.; PLAMONDON, P. et al. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17 and TNF- $\alpha$  induced genes in bone cells. **Journal of leukocyte Biology**, v. 77, p. 388-399, 2005.

SHIMIZU, T.; SASANO, Y.; NAKAJO, S. et al. Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by physical contact with the bone matrix *in vivo*. **Anatomical Record**, v.264, p. 72-81, 2001.

TSIROGIANNI, A.K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 375, p. S5-S12, 2006.

ZHANG, X.; XIE, C.; LIN, A.S.P. et al. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.20, p.2124-2137, 2005.

*Capítulo V*

**CONTRIBUIÇÃO DO PLASMA RICO EM  
PLAQUETAS NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE  
DEFEITOS CRÍTICOS CRIADOS EM CRÂNIOS DE  
CAMUNDONGOS**

*Manuscrito em preparação*

# CONTRIBUIÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS CRÍTICOS CRIADOS EM CRÂNIOS DE CAMUNDONGOS\*

MONTEIRO, Betânia Souza<sup>1</sup>; DEL CARLO, Ricardo Junqueira<sup>2□</sup>; ARGÔLO-NETO, Napoleão Martins<sup>1</sup>; VILORIA, Marlene Isabel Vargas<sup>3</sup>; NEVES, Cinthya Dessaune<sup>1</sup>; BRITO, Ana Flora Souza<sup>1</sup>; BONFÁ, Laila de Paula<sup>1</sup>; FILGUEIRA, Richard Rocha<sup>4</sup>.

## RESUMO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) representa uma concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma e sua aplicação tem contribuído para a reparação de tecidos após alguns procedimentos cirúrgicos, principalmente odontológicos e ortopédicos. No presente estudo foram avaliados de forma macro e microscópica os resultados da aplicação do PRP, proveniente de oito camundongos, em defeitos ósseos críticos de 6,0mm de diâmetro confeccionados em calvária de 24 camundongos isogênicos C57BL/6 jovens, separados em dois grupos experimentais. O grupo controle não recebeu tratamento e no grupo tratado foi depositado, no interior do defeito, 50,0μL plasma em gel contendo  $1,0 \times 10^9$  plaquetas. Constatou-se que o gel de PRP autólogo depositado em defeitos críticos contribuiu positivamente para o processo de reparação óssea, mormente na fase inicial.

**Palavras-chave:** gel autólogo, reparação óssea, fatores de crescimento.

## ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is a concentration of platelets in a small volume of plasma and its application has contributed to the repair of tissues after some surgical procedures, specially dental and orthopedic ones. This study aimed to evaluate macro

---

\* Parte da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. (Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPEMIG).

<sup>1</sup> Estudante de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Professor Titular, Pesquisador CNPq, DVT, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Professora Associada. DVT, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto. Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

□ Autor para correspondência: [ricarlo@ufv.br](mailto:ricarlo@ufv.br). Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

and microscopic results after PRP application, derived from eight mice, in bone critical defects of 6.0mm in diameter realized in cavariation of twenty-four young isogenic mice C57BL/6. Control group didn't receive treatment and in the treated group it was deposited 50.0µL of plasma gel containing  $1.0 \times 10^9$  platelets in the defects. It was found that autologous PRP gel contributed positively to the bone repair process, especially in initial phase.

**Keywords:** autologous gel, bone repair, growth factors.

## INTRODUÇÃO

A reparação óssea é um processo complexo que envolve a quimiotaxia e adesão de células indiferenciadas e jovens à matriz óssea desmineralizada e seqüente proliferação e diferenciação em osteoblasto, seguida por uma fase de organização e estruturação do tecido formado.

A participação de proteínas regulatórias coordenando a biologia celular e molecular da osteogênese (quimiotaxia, angiogênese, proliferação e diferenciação celular) está cada vez mais evidenciada na literatura (Anitua *et al.*, 2004; Viegas *et al.*, 2006). Dentre essas proteínas, destacam-se os fatores de crescimento liberados pelo Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

O PRP representa uma concentração de plaquetas em um pequeno volume de plasma e sua aplicação tem contribuído para a reparação de tecidos (Mazzucco *et al.*, 2004; Kanno *et al.*, 2005), por meio da estimulação quimiotática promovida pela presença de citocinas, quimiocinas, proteínas sanguíneas e fatores de crescimento presentes (Anitua *et al.*, 2004).

Dentre os fatores solúveis destacam-se: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento transformador beta (TGF-β); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) que, em conjunto, influenciam positivamente a quimiotaxia, diferenciação, proliferação e ativação de diversos tipos celulares (Anitua *et al.*, 2004; Kasten *et al.*, 2008). Entre as proteínas distinguem-se: fibrina, fibronectina e vitronectina que, além da ação quimiotática, se

responsabilizam pela adesão celular para osteoindução e agem como matriz para as células sanguíneas, tecido conjuntivo e migração epitelial (Marx, 2004).

A calvária, porção fronto-parietal do crânio, apresenta uma limitada capacidade de reparação que é atribuída a pouca quantidade de suprimento sanguíneo e de osso esponjoso em sua estrutura (Del Carlo *et al*, 1994; Monteiro *et al*, 2007), tornando-a um sítio de escolha para análises relativas a capacidade de osteoindução, osteocondução e mesmo de biomateriais como os fatores de crescimento.

O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análises macro e microscópicas, a contribuição do PRP depositado em defeitos críticos confeccionados em calvária de camundongos C57BL/6 jovens.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado em março/2007, sob parecer número 46/2007, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

**Animais de experimentação:** foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem C57BL/6 isogênicos, com peso corpóreo médio de 30,0 gramas, seis meses de idade. Oito animais foram doadores de sangue para a obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e os demais 24 foram utilizados para a experimentação *in vivo*, separados em dois grupos experimentais iguais.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas<sup>5</sup> de 0,15m<sup>2</sup>, sob fotoperíodo de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, ruídos mínimos, alimentados com ração sólida<sup>6</sup> e água *ad libitum*.

**Obtenção do PRP:** oito animais foram anestesiados com isoflurano, em câmara de gás anestésica, e contidos em decúbito dorsal. Posteriormente, foi realizada toracotomia esternal, o ventrículo esquerdo foi puncionado com uma agulha de 25gauge, e coletado todo o volume sanguíneo circulante, aproximadamente 2,0mL por animal. O sangue foi

---

<sup>5</sup> Gaiolas para roedores SEALS SAFE™ – Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>6</sup> Ração para animais de laboratório, 23%PB, LABINA® PURINA do Brasil, Paulínia, SP, Brasil.

imediatamente transportado para frasco<sup>7</sup> esterilizado contendo anticoagulante citrato de sódio, e centrifugado, durante 5 minutos, a velocidade de 1500rpm. Após a centrifugação, o plasma (camada mais superficial no tubo, de coloração amarelada) foi retirado e colocado em outro frasco e, novamente, centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. Com o auxílio de uma pipeta automática regulável em 100,0µL, a fase mais superficial do plasma (conhecida como plasma pobre em plaquetas) foi desprezada, permanecendo apenas a porção mais rica em plaquetas. O volume total do plasma foi submetido à contagem e distribuído em doze tubos de centrífuga, cada um contendo 50,0µL de plasma acrescido de 25,0µL de gluconato de cálcio 10%, que foram colocados em banho-maria a 37°C até gelação do plasma. Após a formação do gel de PRP, os frascos foram vedados e levados ao centro cirúrgico. O preparo do plasma aconteceu momentos antes da aplicação.

**Experimentação *in vivo*:** os 24 animais foram separados em dois grupos experimentais iguais, grupos controle (GC) e PRP (GP), por meio de sorteio. Todos foram submetidos ao mesmo nível de estresse quanto à manipulação e os grupos experimentais foram conduzidos ao mesmo tempo.

Antecedendo ao ato cirúrgico, os camundongos receberam antibioticoterapia profilática com enrofloxacin (10,0mg/kg, IM), e medicação analgésica à base de morfina (5,0mg/kg, SC), que perdurou por três dias e a cada 8 horas, visando o controle da dor.

Os camundongos foram submetidos à medicação pré-anestésica com xilazina (5,0mg/kg, IP) e indução e manutenção com anestésico inalatório<sup>8</sup>, em câmara de anestesia. Em seguida foram contidos em decúbito ventral, tricotomizados na porção dorsal do crânio, submetidos a anti-sepsia da área tricotomizada com solução povidine-iodine e tiveram o campo operatório delimitado por pano esterilizado.

A pele, subcutâneo e musculatura foram incisados sobre a crista sagital externa do crânio, desde a protuberância occipital até próximo aos olhos, aproximadamente 1,0cm de comprimento, permitindo a exposição do osso parietal. Com auxílio de uma

---

<sup>7</sup> Tubo para tipagem sanguínea - Vacuette®, Campinas, SP, Brasil.

<sup>8</sup> Isoflurano, AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil.

broca<sup>9</sup> de 6,0mm de diâmetro externo, conectada a uma perfuratriz elétrica<sup>10</sup>, na velocidade de 5000rpm e sob irrigação contínua com solução fisiológica, foi realizado um defeito na região parietal, com área aproximada de 28,3mm<sup>2</sup>, transpassando toda espessura da cúpula, com exposição das meninges, que foi mantida íntegra no fundo do defeito.

O grupo PRP teve o defeito preenchido com o 50,0µL de plasma em gel contendo  $1,0 \times 10^9$  plaquetas e o grupo controle não recebeu tratamento. Em ambos os grupos foi colocada uma membrana cortical desmineralizada reabsorvível<sup>11</sup> com extensão de 0,7 x 0,7cm, acima da falha e abaixo da pele. Posteriormente, a pele foi aproximada com fio monofilamentar não-absorvível<sup>12</sup>, em pontos simples separados. Todos os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia, durante todo o período experimental e avaliados quanto ao peso, comportamento e consumo de alimento e água.

**Períodos de avaliações:** três animais de cada grupo foram identificados, pesados e submetidos à eutanásia, por sobredosagem anestésica com tiopental sódico, nos dias 10, 30, 60 e 90 de pós-operatório. Em seguida, cada camundongo foi contido em mesa cirúrgica para coleta de biópsias óssea, envolvendo a região do defeito e a porção adjacente do osso receptor. O fragmento foi identificado, medido, fotografado e conservado em formaldeído 10% tamponado para posterior processamento histológico.

**Avaliação macroscópica:** consistiu na mensuração da área do defeito e estabelecimento do percentual de reparação óssea (área inicial - área mensurada em cada período/área inicial, em milímetros), por meio de análise de fotografias digitais obtidas com escala de mensuração (régua/escalímetro), intensidade de luz e altura da máquina fotográfica digital<sup>13</sup> constantes. As imagens digitais foram transferidas a um computador<sup>14</sup> e analisadas por um programa específico<sup>15</sup>. O local e aspecto do defeito e a presença de crescimento ósseo também foram registrados.

---

<sup>9</sup> Broca trefina cirúrgica – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>10</sup> Microrretífica Dremel – Bosch, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>11</sup> Genderm – Membrana biológica de origem bovina – Genius, Baumer, SP, Brasil.

<sup>12</sup> Nylon 2-0 – Brasuture, São Sebastião da Grama, SP, Brasil.

<sup>13</sup> Sony cybershot® 10.1 megapixels, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>14</sup> Notebook ACER, PentiumCeleron® processador 550, 2.0 Ghz, 533 MHz, 1 MB, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>15</sup> Software de análise de imagens IMAGELAB PRÓ PLUS®, Média Cybernetics, Bethesda, MD, USA

**Análise estatística:** A análise estatística foi realizada com auxílio do software específico<sup>16</sup> e da planilha eletrônica Excel<sup>®</sup>. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de Kolmogorov–Smirnov para verificação da distribuição de normalidade da variável percentual de reparação óssea. Foi estabelecida a média do percentual de reparação óssea em cada período avaliado e foi realizada a análise das amostras independentes mediante a aplicação do Teste t de Student. Para tanto, foi adotado um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (Ribeiro-Júnior & Melo, 2009).

**Avaliação microscópica:** o material coletado foi submetido ao processamento histológico de rotina, incluído em parafina e cortado (5,0 $\mu$ m de espessura) em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio, envolvendo toda a área do defeito e bordas do osso receptor (corte longitudinais) e, posteriormente, foi corado por Hematoxilina e Eosina (H&E). As amostras foram avaliadas quanto à presença e características do tecido de preenchimento, por meio de análise histológica descritiva.

## RESULTADOS

No acompanhamento clínico diário, durante todo o período pós-operatório, não foram observadas perdas de peso, apatia, sinais de infecção ou de lesões neurológicas.

Na avaliação macroscópica dos espécimes, independente do grupo, não foi observado crescimento ósseo fora das margens receptoras e nem abaixo da meninge. Também foi constatada ausência de fechamento total dos defeitos até o período final de avaliação e de aderências entre cérebro, meninges e tecido de reparação.

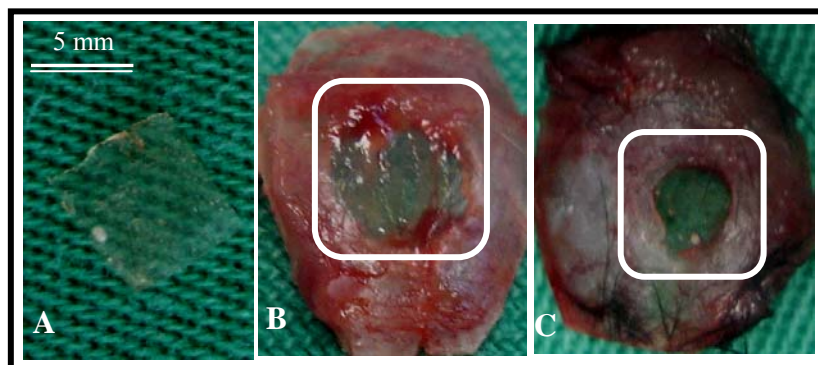
Observou-se, tanto em GC quanto em GP, que o osso novo de preenchimento do defeito apresentava espessura inferior ao osso receptor circunvizinho e que ao longo dos períodos de avaliações, as bordas perdiam suas características de perímetros circulares, tornando-se irregulares, com locais de maior preenchimento.

A membrana desmineralizada depositada acima de todos os defeitos (Fig. 1A) ainda estava presente em dois animais do GC e em um animal do GP, na avaliação realizada aos 10 dias. Essa membrana não foi observada nos demais períodos.

---

<sup>16</sup> Sistema para Análises Estatísticas<sup>®</sup> SAEG v. 9.1, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Ainda, macroscopicamente, foi observado, nos animais de ambos os grupos, um tecido transparente e delgado, cobrindo o defeito, com aparência de tecido cicatricial, acima da área ainda não reparada com tecido ósseo (Figs. 1B e 1C). Apenas em dois animais do GC, um avaliado aos 10 e outro aos 30 dias, e em um animal do GP, avaliado aos 10 dias, esta cobertura de tecido transparente não estava completa.



**Figura 1** – Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório. A) Membrana transparente. B) Região parietal do crânio de camundongo do grupo controle. C) Região parietal do crânio de camundongo do grupo PRP. Em B e C, destaque para a área do defeito ósseo, com bordas irregulares e o tecido transparente e delgado recobrendo a falha.

Por meio da análise da variável percentual de reparação óssea verificou-se que houve diferença estatística entre os dois grupos experimentais nos períodos 10, 60 e 90 dias, sendo que animais do GP apresentaram os melhores valores de reparação. No GP o percentual de reparação ocorrido do dia inicial da lesão até os 10 primeiros dias foi o maior encontrado (35%), e foi diminuindo ao longo dos dias (dia 11 ao 30, 17%; dia 31 ao 60, 10%; dia 61 ao 90, 5%). No GC o maior percentual foi verificado entre os dias 11 e 30 (30%). A tabela 1 apresenta os valores do percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais agrupados nos grupos controle e tratado com PRP e os valores de  $p$  oriundos do estudo estatístico.

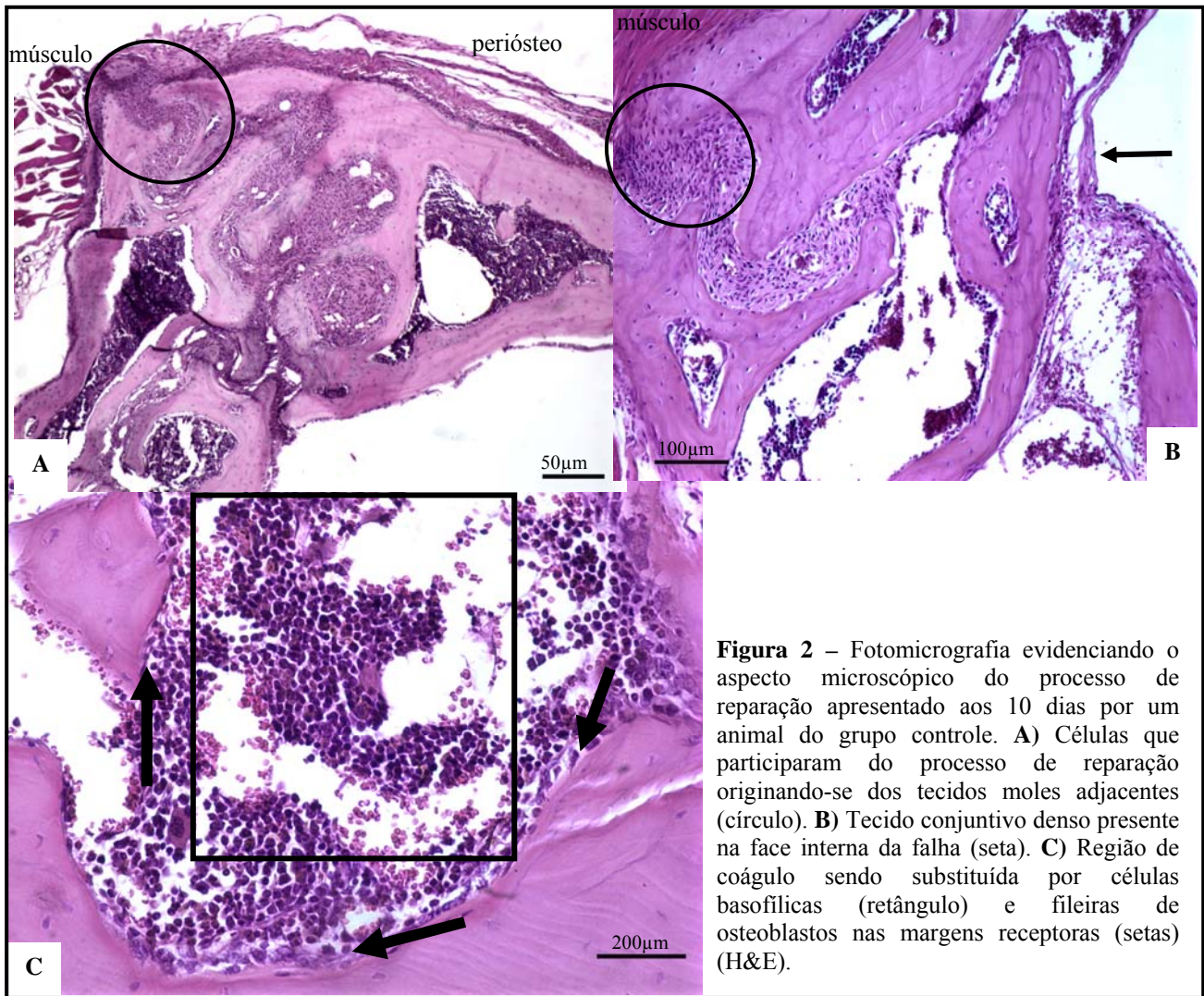
**Tabela 1** - Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com PRP (Tratamento 1= grupo controle. Tratamento 2 = grupo PRP) e os valores de *p* calculados confrontando dados da % de preenchimento ósseo, por período, do tratamento 2 *versus* tratamento 1.

Tratamento	Período (dias)	Médias das áreas (mm <sup>2</sup> )	Percentual de reparação óssea (mm <sup>2</sup> )	Valor de <i>p</i> calculado
GC	10	22,133	21,880	<i>p</i> = 0,0216 <sup>a</sup>
GP	10	18,344	35,253	
GC	30	13,863	51,069	<i>p</i> = 0,2989
GP	30	13,358	52,852	
GC	60	11,843	58,199	<i>p</i> = 0,0002 <sup>a</sup>
GP	60	10,719	62,166	
GC	90	10,495	62,957	<i>p</i> = 0,0285 <sup>a</sup>
GP	90	9,196	67,542	

<sup>a</sup> valores estatisticamente significativos – *p* ≤ 0,05

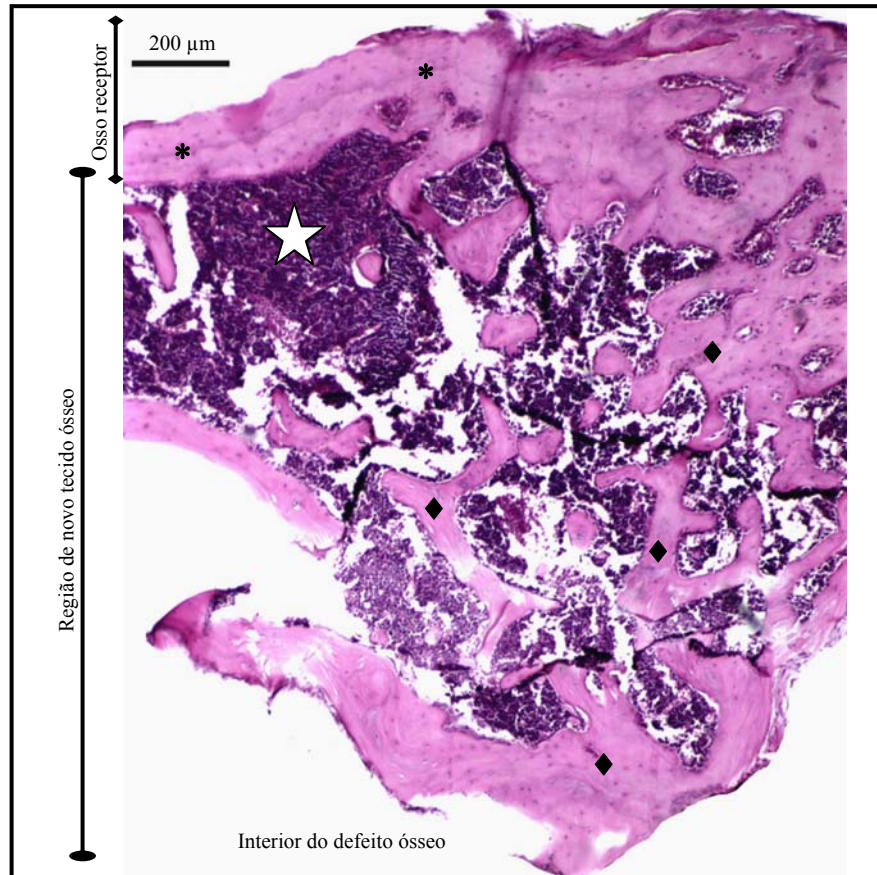
Os exames realizados sob microscopia de luz revelaram que o tecido transparente e delgado, que recobria as falhas em GC e GP, estava constituído de tecido conjuntivo denso com diferentes graus de celularidade e não continha células inflamatórias

No **grupo controle**, aos 10 dias, observou-se multiplicação celular com discreta formação óssea nas bordas do defeito e em direção ao centro. Foi verificada a presença de tecido de granulação, com infiltrado de células basofílicas, substituindo a região anteriormente ocupada pelo coágulo sanguíneo. A maioria das células que participavam do processo de reparação originaram-se, principalmente, dos tecidos moles (periósteo e musculatura) presentes nas extremidades do defeito (Fig. 2).



**Figura 2** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle. **A)** Células que participaram do processo de reparação originando-se dos tecidos moles adjacentes (círculo). **B)** Tecido conjuntivo denso presente na face interna da falha (seta). **C)** Região de coágulo sendo substituída por células basofílicas (retângulo) e fileiras de osteoblastos nas margens receptoras (setas) (H&E).

Aos 30 dias, em algumas amostras, percebeu-se maior formação óssea em comparação ao período anterior, com o novo tecido dispondo-se em ilhas circundadas por tecido de granulação e insinuando-se para o interior de defeito (Fig. 3). Nesse momento, os vasos sanguíneos de permeio ao tecido de granulação estavam presentes em quantidade superior à observada aos 10 dias.

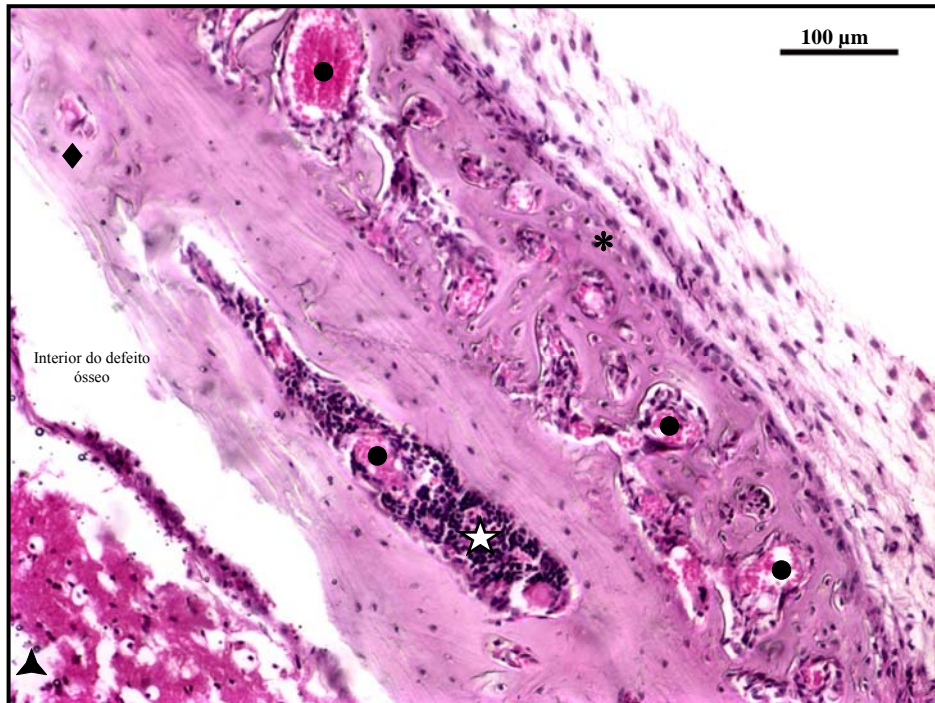


**Figura 3** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle. Região de reparação com formação de novo tecido ósseo (♦), rodeado por células basofílicas (☆) e insinuando-se para o interior da falha a partir do osso receptor (\*) (H&E).

Aos 60 e 90 dias o crescimento ósseo foi progressivo em relação ao tempo de observação, com presença de medula óssea com células mononucleares entremeando a díploe óssea. Foi visualizada presença de células grandes, arredondadas, com citoplasma eosinofílico e núcleo basofílico sugestivas de megacariócitos.

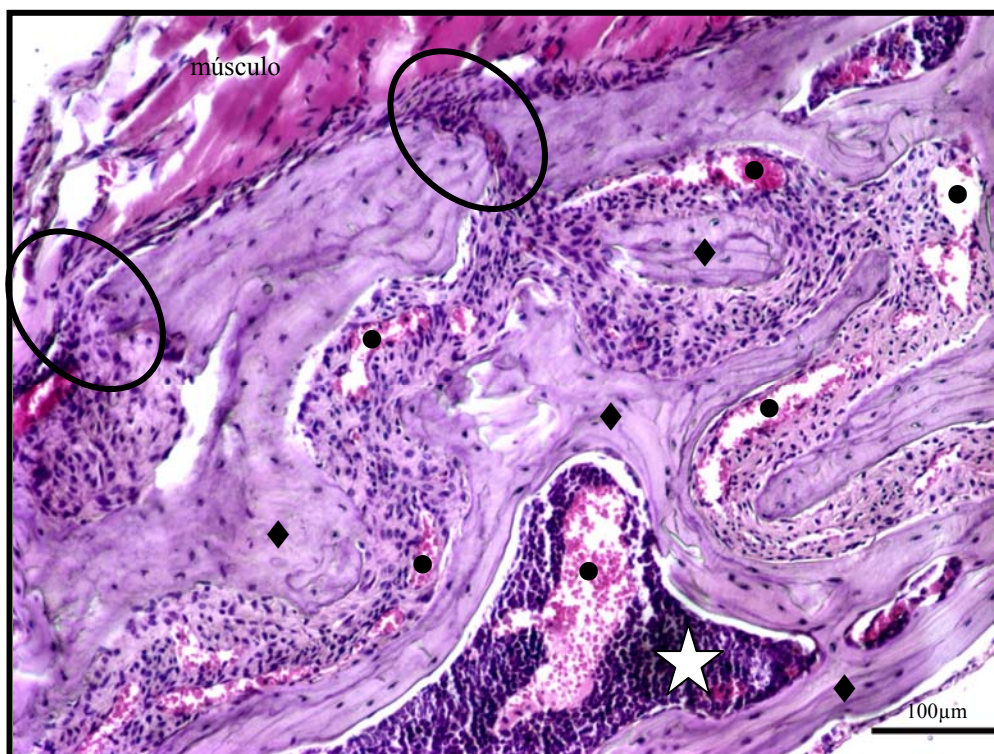
A angiogênese observada no **grupo PRP (GP)** em todos os períodos foi maior que a observada no GC. No período inicial de 10 dias, foi visualizada a maior intensidade de neovascularização no grupo tratado (Fig. 4), com presença de vasos sanguíneos congestionados nas margens do defeito ósseo. Observou-se que a angiogênese diminuiu ao longo dos períodos, mantendo-se concentrada próxima as regiões de formação de novo osso. Também foi visualizado infiltrado celular constituído de células basofílicas

substituindo a região anteriormente ocupada pelo coágulo sanguíneo (Fig. 4), similar ao observado no GC.



**Figura 4** – Fotomicrografia exibindo aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo PRP. Exuberante angiogênese (●), osso receptor (\*) e presença de células basofílicas no interior do tecido de granulação (☆), discreta formação de novo osso (◆) e início de substituição do coágulo sanguíneo (▲) por células basofílicas (H&E).

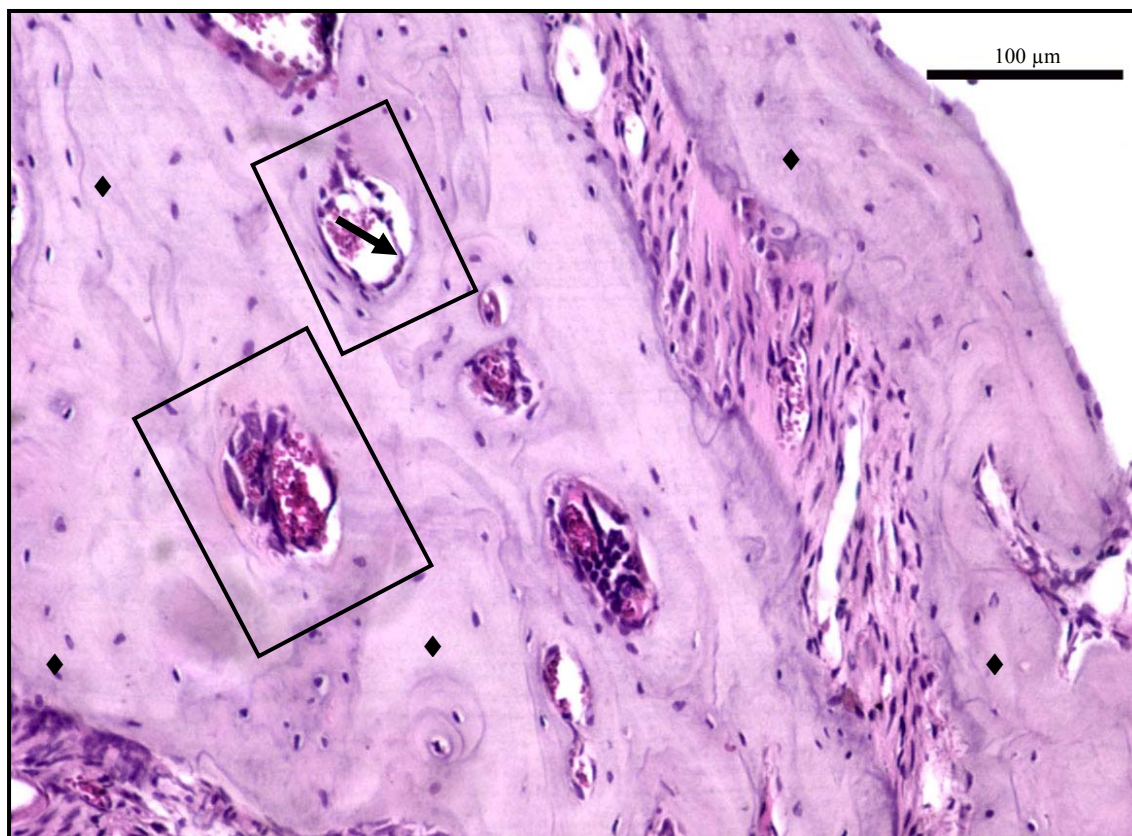
No GP, aos 30 dias, a área de formação de novo osso, assim como o observado macroscopicamente, foi superior à encontrada no GC e essa formação aumentava à medida que os períodos de avaliação avançavam. Também percebeu-se uma intensa movimentação celular provinda da região de tecidos moles adjacentes para o interior do defeito (Fig. 5).



**Figura 5** – Fotomicrografia exibindo o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo PRP. Formação de novo osso e organização do tecido osteóide (◆), movimentação celular (elipse) oriunda da região de tecidos moles adjacentes, vasos sanguíneos (●), presença de células basofílicas (☆) (H&E).

Aos 60 e 90 dias evidenciaram-se maiores quantidades de formações ósseas e organização tecidual. A quantidade e o amadurecimento do osso formado progrediram concomitantemente com o avançar do tempo de observação, e aos 90 dias já se observava alguns ósteons (Fig. 6).

Os tipos celulares presentes em ambos os grupos foram os mesmos. Visualizou-se osteoblastos cubóides em atividade de deposição de matriz óssea, se enfileirando nas margens da nova formação óssea e discreta presença de osteoclastos, sobretudo visualizados aos 60 e 90 dias, próximos ao tecido osteóide formado. No GP havia maior quantidade de osteoblastos e tecido osteóide se organizando quando comparado ao GC.



**Figura 6** – Fotomicrografia demonstrando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 90 dias por um animal do grupo PRP. Formação e organização do novo osso (◆) e presença de ósteons em formação (retângulo) e fileiras de osteoblastos se disposto em fileiras (setas) (H&E).

## DISCUSSÃO

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é definido como uma concentração autóloga de plaquetas num pequeno volume de plasma e é considerado uma rica fonte de fatores de crescimento (Marx, 2004). Esses fatores liberados pela a ativação do PRP são capazes de ligarem-se a receptores de membrana expressos por células mesenquimais, epidermais, epiteliais, fibroblastos, osteoblastos e demais células que participam dos processos de reparação do organismo, acarretando a ativação de proteínas endógenas com conseqüente indução da proliferação celular, formação de matriz, síntese de colágeno e formação óssea e por isso, tem sido aplicados em processos reparadores do organismo.

A investigação dos efeitos do PRP em gel na reparação de falhas criadas em crânio de camundongos justifica-se pela controvérsia, estabelecida em trabalhos

recentes, acerca da função do PRP, na qual alguns fatores influenciariam negativamente sua eficácia na promoção da reparação óssea, como por exemplo: o tipo do biomaterial associado, a espécie animal, o local de implantação e a forma de preparo e ativação do plasma (Kasten *et al.*, 2008; Del Carlo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009).

Ademais, a reparação de defeitos cranianos ainda representa um desafio devido à pequena capacidade de deposição óssea nessa região e, objetivando solução, diversos substitutos ósseos e agentes reparadores vêm sendo utilizados (Del Carlo *et al.*, 1994; Monteiro *et al.*, 2007). Assim, nesse contexto de resultados controversos e dificuldades experimentais, o PRP surge como alternativa.

Verificou-se que o PRP em gel, como tratamento das falhas na porção parietal do crânio dos camundongos, acarretou maior formação óssea em relação ao grupo controle, contudo, ao final do período de avaliação aos 90 dias, os defeitos não estavam totalmente preenchidos. Tal característica evidencia a criação de um defeito crítico na calvária do camundongo (6,0mm), concordando com dados disponíveis na literatura que consideram críticos os defeitos com diâmetro superior a 2,7mm (Seo *et al.*, 2008). Conseqüentemente, por mais que o tratamento com o gel tenha incrementado o processo de reparação, ele não foi suficiente para promovê-la de forma total.

O estudo estatístico confirmou que o tratamento incrementou o processo de reparação óssea e acarretou maior crescimento de novo osso, sobretudo na fase mais precoce. Portanto, o efeito do gel de PRP ocorreu especialmente durante os estágios iniciais do processo de reparação, primeiros dias após a aplicação, mediante a liberação maciça dos fatores de crescimento presentes no plasma, com também encontraram MARX *et al.*, (1998).

A diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo controle, aos 10, 60 e 90 dias de avaliação, permite inferir que a liberação dos fatores de crescimento, providenciada pelo PRP, determinou maior recrutamento celular, ativação de células osteocomprometidas e conseqüente deposição de tecido ósseo a partir das margens da falha. Em acréscimo, como em todo processo de reparação óssea, observou-se que nas fases iniciais de hemostasia e inflamação ocorreram maior recrutamento celular e conseqüente deposição de matriz óssea, seguida por uma fase de remodelação óssea, onde houve menor recrutamento celular e maior atividade osteoclástica. Assim, a

quantidade e o amadurecimento do osso formado progrediram concomitantemente com o avançar do tempo de observação, e aos 90 dias já se observava alguns ósteons.

Outra inferência possível, é que a quantidade de  $1,0 \times 10^9$  plaquetas (concentração de  $2,0 \times 10^7$  plaquetas/ $\mu$ L) foi adequada na promoção de recrutamento celular, concordando com Kanno *et al.* (2005) quando afirmaram que altas concentrações de plaquetas estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos e com Weibrich *et al.* (2004) que reportaram que a concentração mínima para apropriado benefício biológico nos processos de reparação é de  $1,0 \times 10^7$  plaquetas/ $\mu$ L.

A membrana cortical desmineralizada reabsorvível, utilizada acima dos defeitos em ambos os grupo, teve a finalidade de evitar a dispersão do material depositado uma vez que o camundongo não possui musculatura e tecido subcutâneo, nessa região da calvária, em quantidade suficiente para serem suturadas e impedir o extravasamento das células que foram utilizadas no tratamento. Na avaliação realizada aos 30 dias em ambos os grupos, ela não estava mais presente concordando com os dados do estudo piloto preliminar, realizado pelos autores, que constatou que ela não influencia o processo de reparação óssea, sendo totalmente reabsorvida num período de 15 dias.

A substituição do coágulo por tecido de granulação visualizado em ambos os grupos, também é descrita por outros autores, em processos de cicatrização do organismo (Martin,1997; Tsirogianni *et al.*, 2006). Num processo de reparação tecidual, a primeira fase de reparação envolve a formação e organização do coágulo sanguíneo, durante as 24 horas iniciais. Após esse período, o coágulo começa a ser substituído e, por volta do nono a décimo primeiro dia está completa a substituição por tecido de granulação. Corroborando afirmação desse autor, principalmente no GP, foi visualizada a substituição do coágulo por células basofílicas nos primeiros 10 dias e presença de tecido inflamatório constituído de células basofílicas.

A maior formação óssea e angiogênese exuberante, presente no grupo PRP, já haviam sido descritas por outros pesquisadores que afirmaram, em defesa ao uso do PRP, que após a ativação do gel de plaquetas, ocorre a liberação de citocinas e fatores de crescimento essenciais para a progressão coordenada do processo de cicatrização, aumento da vascularização e regeneração tecidual (Marx *et al.*, 1998; Aghaloo *et al.*, 2004; Marx, 2004). Ademais, dentre os fatores de crescimento liberados pela ativação

do plasma, destaca-se a presença do PDGF, que é considerado o primeiro fator de crescimento liberado na reparação tecidual, sendo secretado pelos macrófagos e células endoteliais. Ele apresenta numerosos efeitos positivos, incluindo angiogênese, mitogênese de células da medula óssea e de pré-osteoblastos, e a ativação da diferenciação de osteoblastos maduros que irão estimular a deposição de proteínas na matriz óssea (Marx, 2004).

Silva *et al.*(2009) utilizaram o PRP em gel na reparação óssea em calvária de coelhos e obtiveram bons resultados quanto a reparação. Porém, identificaram a presença de células gigantes e multinucleadas de permeio as novas formações ósseas. Na ocasião, consideraram a presença dessas células uma conseqüência de reação inflamatória tipo corpo estranho, incitada pela tromboplastina comercial derivada do cérebro de coelho, usada na preparação do gel. De forma divergente, no estudo atual, o gel de plaquetas foi ativado por gluconato de cálcio 10% e a reação inflamatória observada não apresentava características de reação tipo corpo estranho, não sendo visualizadas células gigantes e multinucleadas.

No período inicial de avaliação, uma marcante presença de infiltrado celular contendo células basofílicas foi visualizada no GP e com base em afirmações prévias (Deans & Moseley, 2000; Bobis *et al.*,2006) é possível inferir que essas células que participaram do processo de reparação possam ter sofrido influência quimiotática dos fatores solúveis liberados no meio pelo PRP, explicando essa maior quantidade de células.

Ademais, Lacey *et al.* (2009) demonstraram o potencial das citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), influenciando positivamente o potencial osteogênico por favorecer a produção de osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do fator  $\kappa$ B nuclear (RANKL), duas citocinas que atuam nos processos de deposição e reabsorção óssea e tal fato pode explicar a maior quantidade de formações de novo osso no grupo tratado.

Com o avançar dos períodos de observações, à medida que a formação óssea foi se consolidando e a atividade dos osteoblastos e das células osteoprogenitoras foi diminuindo, observou-se concomitantemente redução do processo inflamatório. Pode-se inferir que a liberação de citocinas pró-inflamatórias também regrediu uma vez que é

dependente do processo inflamatório e dos fatores solúveis consumidos durante a reparação. Também nessa fase não havia necessidade de prover tantos estímulos para as células osteogênicas.

Outro achado de destaque, na avaliação microscópica, foi uma intensa mobilização celular da periferia da lesão, região de tecidos moles, para o centro da falha, principalmente no GP, demonstrando que houve contribuição positiva das células ósseas presentes no periósteo. Shimizu *et al.* (2001) já haviam demonstrado que dentre as células que constituem o periósteo existem células progenitoras com potencial de se diferenciar em osteoblastos, passíveis de ser ativadas por estimulação física ou química, como nos casos de fraturas, inflamações e desenvolvimento de tumores, e que contribuem para a reparação.

## **CONCLUSÃO**

Sob as condições nas quais foi desenvolvido o experimento, constata-se por meio das avaliações macroscópicas, estatísticas e microscópicas que o uso do gel de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) autólogo, depositado em defeitos críticos confeccionadas em calvária de camundongos C57BL/6 jovens contribui positivamente para o processo de reparação óssea, mormente na fase inicial.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio recebido.

## **REFERÊNCIAS**

AGHALOO, T.L.; MOY, P.K.; FREYMILLER, E.G. Evaluation of Platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.19, p.59–65, 2004.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, v.91, p.4–15, 2004.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potencial clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p. 875-884, 2000.

DEL CARLO, R.J.; IAMAGUTI, P.; BRANCO, M.D.L. et al. Cranioplastia por interposição de auto-enxerto costal. III. Aspectos da enxertia óssea. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, p. 244-252, 1994.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; SILVA, P.S.A. et al. Aspectos microscópicos da reparação mediada por plasma rico em plaquetas e autoenxerto esponjoso em falhas ósseas experimentais no crânio de coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, p. 152-160, 2009.

KANNO, T.; TAKAHASHI, T.; TSUJISAWA, T. et al. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, p. 362-369, 2005.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, F. et al. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v.29, p. 3983-3992, 2008.

LACEY, D.C.; SIMMONS, P.J.; GRAVES, S.E. et al., Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation, **Osteoarthritis and Cartilage**, 2009. doi:10.1016/j.joca.2008.11.011

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 85, p. 638-46, 1998.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MAZZUCCO, L.; MEDICI, D.; SERRA, M. et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. **Transfusion**, v. 44, p. 1013-1018, 2004.

MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, R.J; PINHEIRO, L.C.P. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas a osso esponjoso autógeno na reparação de falhas experimentais na calota craniana de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.745-751, 2007.

RIBEIRO-JÚNIOR, J.I; MELO, A.L.P. Guia prático para a utilização do SAEG. Viçosa: Folhas Artes Gráficas. 2009.288p.

SEO, B.M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v.14, p. 428-434, 2008.

SHIMIZU, T.; SASANO, Y.; NAKAJO, S. et al. Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by physical contact with the bone matrix in vivo. **Anatomical Record**, v.264, p. 72-81, 2001.

SILVA, P.S.A; DEL CARLO, R.J; SERAKIDES, R. et al. Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v.39, p.129-134, 2009.

TSIROGIANNI, A.K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 375, p. S5-S12, 2006.

VIEGAS, C.A.A; DIAS, M.I.R.; AZEVEDO, J.M.T. et al. The Platelet-Rich Plasma utilization in regeneration of alveolar and cortical bone tissue. Experimental studies in a periodontal bone defect model in Beagle dog (*Canis familiaris*) and in a cortical bone defect model in sheep (*Ovis aries*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.101, p.193-213, 2006.

WEIBRICH,G.; HANSEN, T.; KLEIS, W. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. **Bone**, v.34, p. 665– 671, 2004.

## *Capítulo VI*

# **ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REPARAÇÃO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS**

*Manuscrito em preparação*

## ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA REPARAÇÃO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS\*

MONTEIRO, Betânia Souza<sup>1</sup>; DEL CARLO, Ricardo Junqueira<sup>2□</sup>; ARGÔLO-NETO, Napoleão Martins<sup>1</sup>; NARDI, Nance Beyer<sup>3</sup>; VILORIA, Marlene Isabel Vargas<sup>4</sup>; CHAGASTELLE, Pedro César<sup>5</sup>; NEVES, Cinthya Dessaune<sup>1</sup>, BONFÁ, Laila de Paula<sup>1</sup>; FILGUEIRAS, Richard Rocha<sup>6</sup>; REIS, Amanda Maria Sena<sup>7</sup>.

### RESUMO

Novas estratégias terapêuticas objetivando a reparação óssea em regiões que apresentam difícil propensão à cura combinam a terapia celular com células osteogênicas, fatores de crescimento osteoindutores e veículos biocompatíveis. No presente estudo foram avaliados os efeitos da associação das células-tronco mesenquimais (MSC) oriundas da medula óssea de oito camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> e expandidas em culturas, com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) provenientes de outros oito camundongos, na reparação de defeitos críticos confeccionados em calvária de 24 camundongos C57BL/6 jovens. Os animais foram submetidos a um defeito craniano de 6,0mm de diâmetro e separados em dois grupos experimentais iguais. O grupo controle não recebeu tratamento e no grupo tratado foi administrado, no interior do defeito, *pellet* de MSC contendo  $1,0 \times 10^7$  células/mL associado com 50,0 $\mu$ L de plasma em gel autólogo contendo  $1,0 \times 10^9$  plaquetas. Constatou-se que a associação das células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> com gel de PRP aplicadas em defeitos ósseos críticos confeccionadas em calvária de

---

\* Parte da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil. (Apoio Financeiro CAPES, CNPq e FAPEMIG).

<sup>1</sup> Estudante de Pós-graduação em Medicina Veterinária, DVT, UFV.

<sup>2</sup> Professor Titular, Pesquisador CNPq. DVT, UFV.

<sup>3</sup> Professora Titular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Professora Associada. DVT, UFV.

<sup>5</sup> Estudante de Pós-graduação em Imunogenética da UFRGS.

<sup>6</sup> Professor Adjunto. Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

<sup>7</sup> Estudante de graduação, UFV, bolsista de Iniciação Científica FAPEMIG.

□ Autor para correspondência: [ricarlo@ufv.br](mailto:ricarlo@ufv.br). Campus da UFV, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

camundongos C57BL/6 jovens, contribuiu positivamente para o processo de reparação óssea.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, gel de plaquetas autólogo, reparação óssea.

## ABSTRACT

New therapeutic strategies aiming to induce bone repair in areas that have difficult propensity to cure combine cell therapy with osteogenic cells, osteoinductive growth factors, and biocompatible vehicles. This study evaluated the effects of mesenchymal stem cells (MSC) from eight mice C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> bone marrows expanded in cultures associated with platelets rich plasma (PRP) deriving from another eight mice, in the repair of critical defects in calvarial bone produced in twenty-four young isogenic mice C57BL/6. The animals were subjected to a cranial defect of 6.0mm in diameter and divided into two equal experimental groups. Control group did not receive treatment and the treated group received a MSC pellet containing  $1.0 \times 10^7$  cells/mL associated with 50.0 $\mu$ L of plasma gel containing  $1.0 \times 10^9$  autologous platelets within the defect. In these experimental conditions, it was found that mesenchymal stem cells derived from bone marrow of C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> mice associated with PRP gel applied in bone critical defects produced in calvarial contributes positively to the process of bone repair.

**Keywords:** mesenchymal stem cell, platelets gel, cell therapy.

## INTRODUÇÃO

Novas terapias visando a reparação tecidual em regiões que apresentam difícil cicatrização, como os ossos do crânio e da mandíbula tem utilizado a terapia celular com células osteogênicas associada a fatores de crescimento osteoindutores e veículos biocompatíveis (Pieri *et al.*, 2009). No contexto da utilização de um moderno arsenal terapêutico, algumas pesquisas associam células-tronco mesenquimais (MSC) com diferentes fatores de crescimento, dentre eles, os fatores provindos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), importantes na indução da formação óssea (Kasten *et al.*, 2008a).

As MSC são células-tronco somáticas presentes em nichos especializados nas regiões perivasculares dos tecidos adultos (Meirelles *et al.*, 2008; Caplan, 2009), com potencial de se diferenciar em multilinhagens celulares, dentre elas, as portadoras de fenótipo osteogênico (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999). Esse tipo celular é rotineiramente isolado de diversos tecidos, destacando-se a medula óssea (MO), e amplamente expandido, por meio de sucessivas mitoses. Em culturas, exibem propriedades inerentes como formato fibroblastóide das células, adesão em substrato plástico, capacidade de auto-renovação e capacidade de se diferenciar, sob condições adequadas de cultivo, em diferentes tipos celulares (Nardi & Meirelles, 2006).

A plasticidade aliada a habilidades de expansão, efeitos imunomodulatórios e a possibilidade de serem vetores para genes terapêuticos, tornam esse grupo celular alvo de grande interesse na medicina regenerativa (Deans & Moseley, 2000; Muraki *et al.*, 2006).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) tem sido descrito como um biomaterial acelerador da formação óssea que contém proteínas sanguíneas e grande número de plaquetas liberadoras de diferentes tipos e quantidades de fatores de crescimento (FC) com características osteoindutoras (Marx *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2009).

Dentre os fatores solúveis destacam-se: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) que, em conjunto, influenciam positivamente a quimiotaxia, diferenciação, proliferação e ativação de diversos tipos celulares (Kasten *et al.*, 2008b; Anitua *et al.*, 2004). Entre as proteínas distinguem-se: fibrina, fibronectina e vitronectina que, além da ação quimiotática, se responsabilizam pela adesão celular para osteoindução e suporte estrutural para as células sanguíneas, tecido conjuntivo e migração epitelial (Marx, 2004).

Os mecanismos básicos e interações dos fatores solúveis liberados pelo plasma com as células indiferenciadas do estroma ainda não estão bem elucidados (Kasten *et al.*, 2008a). Estudos *in vitro* têm demonstrado que os FC liberados pelo plasma são fortemente mitogênicos para as MSC e para as células de linhagem osteoblástica (Van Den Dolder *et al.*, 2006). *In vivo*, têm sido sugerido efeito sinérgico da associação de

MSC com PRP, resultando em aumento da formação óssea em regiões de difícil consolidação, como a maxilofacial e o crânio (Pieri *et al.*, 2009)

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da associação das células-tronco mesenquimais (MSC) oriundas da medula óssea e expandidas em culturas, com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) na reparação de defeitos críticos confeccionados em calvária de camundongos C57BL/6 jovens.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aprovado em março/2007, sob parecer número 46/2007, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

**Animais de experimentação:** foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6 isogênicos, com peso corpóreo médio de 30,0 gramas, seis meses de idade. Oito animais foram doadores de sangue para a obtenção de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), oito animais foram doadores de medula óssea para a realização da cultura celular e os demais 24 foram utilizados para a experimentação *in vivo*, separados em dois grupos experimentais iguais.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas<sup>8</sup> de 0,15m<sup>2</sup>, sob fotoperíodo de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, ruídos mínimos, alimentados com ração sólida<sup>9</sup> e água *ad libitum*.

**Obtenção do PRP:** oito animais foram anestesiados com isoflurano, em câmara de gás anestésica, e contidos em decúbito dorsal. Posteriormente, foi realizada toracotomia esternal, o ventrículo esquerdo foi puncionado com uma agulha de 25gauge, e coletado todo o volume sanguíneo circulante, aproximadamente 2,0mL por animal. O sangue foi imediatamente transportado para frasco<sup>10</sup> esterilizado contendo anticoagulante citrato de sódio, e centrifugado, durante 5 minutos, a velocidade de 1500rpm. Após a centrifugação, o plasma (camada mais superficial no tubo, de coloração amarelada) foi

<sup>8</sup> Gaiolas para roedores SEALSAFE™ – Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>9</sup> Ração para animais de laboratório, 23%PB, Labina® Purina do Brasil, Paulínia, SP, Brasil.

<sup>10</sup> Tubo para tipagem sanguínea - Vacuette®, Campinas, SP, Brasil.

retirado e colocado em outro frasco e, novamente, centrifugado por 5 minutos a 1500rpm. Com o auxílio de uma pipeta automática regulável em 100,0µL, a fase mais superficial do plasma (conhecida como plasma pobre em plaquetas) foi desprezada, permanecendo apenas a porção mais rica em plaquetas. O volume total do plasma foi submetido à contagem e distribuído em doze tubos de centrifuga, cada um contendo 50,0µL de plasma acrescido de 25,0µL de gluconato de cálcio 10%, que foram colocados em banho-maria a 37°C até gelação do plasma. Após a formação do gel de PRP, os frascos foram vedados e levados ao centro cirúrgico. O preparo do plasma aconteceu momentos antes da aplicação.

**Cultura de células-tronco mesenquimais:** as células da cultura primária foram coletadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 transgênicos para o gene repórter *gfp* (green protein fluorescence, proteína verde fluorescente) e depositadas em placa de crescimento de cultura celular<sup>11</sup> com meio de cultura<sup>12</sup> e mantidas em estufa incubadora<sup>13</sup> à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%. Quando o crescimento celular apresentava aproximadamente 80% de células confluentes, foi realizada a tripsinização, contagem e repique destas células para garrafas de cultura<sup>14</sup> de 25,0cm<sup>2</sup>.

**Expansão da cultura primária:** o meio de cultura<sup>15</sup> da garrafa<sup>16</sup> foi totalmente retirado e as garrafas foram lavadas com 3,0mL de solução fosfato salina tamponante (PBS 1x, pH 7,2). Em seguida, as células aderidas ao fundo da garrafa foram tripsinizadas com solução de tripsina 0,25%<sup>17</sup> e incubadas<sup>18</sup> à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%, durante 5 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 5,0mL de meio completo e a suspensão contendo as MSC foi transferida para tubos de centrifuga<sup>19</sup> e centrifugadas<sup>20</sup> à temperatura de 22°C e 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o *pellet* foi ressuspensado em tubos de centrifuga contendo 1,0mL de PBS 1x.

---

<sup>11</sup> Placa de crescimento celular de seis poços TPP, Trasadingen, Switzerland.

<sup>12</sup> Meio para cultura celular DMEM. Sigma Chemycal Co., St. Louis, MO, USA.

<sup>13</sup> Incubadora VELP® – Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>14</sup> Garrafa para cultivo de tecidos, poliestireno estéril – Cultilab, Campinas, SP, Brasil

<sup>15</sup> Meio para cultura celular DMEM. Sigma Chemycal Co., St. Louis, MO, USA.

<sup>16</sup> Garrafa para cultura de tecidos - Cultilab®, Campinas, SP, Brasil.

<sup>17</sup> Solução de Tripsina-EDTA 1x, frasco com 100mL. Sigma Chemycal Co., St. Louis, MO, USA

<sup>18</sup> Incubadora VELP®, Instrulab, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>19</sup> Tubo de centrifuga tipo Falcon com capacidade de 15mL - ACQuimica – Paulínia, SP - Brasil.

<sup>20</sup> Citocentrífuga de bancada CT12 Presvac®, Itajaí, SC, Brasil.

Uma alíquota de 10,0µL desta solução foi diluída em 10,0µL de corante Azul de Tripán e homogeneizada num frasco de vidro esterilizado. Esta solução foi utilizada para contagem celular em câmara de Neubauer, conforme o preconizado por Meirelles & Nardi (2003) e Bittencourt *et al.*(2006).

Quando obtida a concentração celular mínima de  $1,0 \times 10^7$  células/mL (Meirelles & Nardi, 2003) os tubos contendo as MSC foram novamente centrifugados, em temperatura de 22°C e 1500rpm por 10 minutos, acondicionados em caixa térmica e transportados para o centro cirúrgico do Hospital Veterinário da UFV, visando o transplante imediato nos camundongos C57BL/6 isogênicos. No momento da aplicação o sobrenadante foi desprezado e apenas o *pellet* foi utilizado.

Quando a concentração celular não era obtida, a suspensão foi diluída em 5,0mL de meio de cultura enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), e transferida para nova da garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>, mantida em estufa incubadora à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%, por sete dias, até a reavaliação da concentração celular.

**Experimentação *in vivo*:** os 24 animais foram separados em dois grupos experimentais iguais, grupo controle (GC) e o grupo associação MSC/PRP (GMP). Todos foram submetidos ao mesmo nível de estresse quanto à manipulação e os grupos experimentais foram conduzidos ao mesmo tempo.

Antecedendo ao ato cirúrgico, os camundongos receberam antibioticoterapia profilática com enrofloxacina (10,0mg/kg, IM) e medicação analgésica à base de morfina (5,0mg/kg, SC), que perdurou por três dias e a cada 8 horas, visando o controle da dor.

Os camundongos foram submetidos à medicação pré-anestésica com xilazina (5,0mg/kg, IP) e indução e manutenção com anestésico inalatório<sup>21</sup>, em câmara de anestesia. Em seguida foram contidos em decúbito ventral, tricotomizados na porção dorsal do crânio, submetidos a anti-sepsia da área tricotomizada com solução povidine-iodine e tiveram o campo operatório delimitado por pano esterilizado.

A pele, subcutâneo e musculatura foram incisados sobre a crista sagital externa do crânio, desde a protuberância occipital até próximo aos olhos, aproximadamente

---

<sup>21</sup> Isoflurano, Astra Zeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil.

1,0cm de comprimento, permitindo a exposição do osso parietal. Com auxílio de uma broca<sup>22</sup> de 6,0mm de diâmetro externo, conectada a uma perfuratriz elétrica<sup>23</sup>, na velocidade de 5000rpm e sob irrigação contínua com solução fisiológica, foi realizado um defeito na região parietal, com área aproximada de 28,3mm<sup>2</sup>, transpassando toda espessura da diploe, com exposição das meninges, que foi mantida íntegra no fundo do defeito.

No grupo MSC/PRP (GMP) a falha foi preenchida com o *pellet* contendo 1,0 x 10<sup>7</sup> células/mL e 50,0µL de plasma em gel contendo 1,0 x 10<sup>9</sup> plaquetas e o grupo controle não recebeu tratamento. Em ambos os grupos foi colocada uma membrana cortical desmineralizada reabsorvível<sup>24</sup> com extensão de 0,7 x 0,7cm, acima da falha e abaixo da pele. Posteriormente, a pele foi aproximada com fio monofilamentar não-absorvível<sup>25</sup>, em pontos simples separados. Todos os animais foram observados diariamente, duas vezes ao dia, durante todo o período experimental e avaliados quanto ao peso, comportamento e consumo de alimento e água.

**Períodos de avaliações:** três animais de cada grupo foram identificados, pesados e submetidos à eutanásia, por sobredosagem anestésica com tiopental sódico, nos dias 10, 30, 60 e 90 de pós-operatório. Em seguida, cada camundongo foi contido em mesa cirúrgica para coleta de biópsias óssea, envolvendo a região do defeito e a porção adjacente do osso receptor. O fragmento foi identificado, medido, fotografado e conservado em formaldeído a 10% tamponado para posterior processamento histológico e realização de reação em cadeia de polimerase.

**Avaliação macroscópica:** consistiu na mensuração da área do defeito e estabelecimento do percentual de reparação óssea (área inicial - área mensurada em cada período/área inicial, em milímetros), por meio de análise de fotografias digitais obtidas com escala de mensuração (régua/escalímetro), intensidade de luz e altura da máquina fotográfica digital<sup>26</sup> constantes. As imagens digitais foram transferidas a um computador<sup>27</sup> e

---

<sup>22</sup> Broca trefina cirúrgica – Neodent Implante Osteointegrável, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>23</sup> Microrretífica Dremel – Bosch, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>24</sup> Genderm – Membrana biológica de origem bovina – Genius, Baumer, SP, Brasil.

<sup>25</sup> Nylon 2-0 – Brasuture, São Sebastião da Grama, SP, Brasil.

<sup>26</sup> Sony cybershot® 10.1 megapixels, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>27</sup> Notebook ACER, PentiumCeleron® processador 550, 2.0 Ghz, 533 MHz, 1 MB, São Paulo, SP, Brasil.

analisadas por um programa específico<sup>28</sup>. O local e aspecto do defeito e a presença de crescimento ósseo também foram registrados.

**Análise estatística:** A análise estatística foi realizada com auxílio do software específico<sup>29</sup> e da planilha eletrônica Excel<sup>®</sup>. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de Kolmogorov–Smirnov para verificação da distribuição de normalidade da variável percentual de reparação óssea. Foi estabelecida a média do percentual de reparação óssea em cada período avaliado e foi realizada a análise das amostras independentes mediante a aplicação do Teste t de Student. Para tanto, foi adotado um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p \leq 0,05$ ) (Ribeiro-Júnior & Melo, 2009).

**Avaliação microscópica:** o material coletado foi submetido ao processamento histológico de rotina, incluído em parafina e cortado (5,0 $\mu$ m de espessura) em micrótomo de impacto com navalha de tungstênio, envolvendo toda a área do defeito e bordas do osso receptor (corte longitudinais) e, posteriormente, foi corado por Hematoxilina e Eosina (H&E). As amostras foram avaliadas quanto à presença e características do tecido de preenchimento, por meio de análise histológica descritiva.

**Extração de DNA:** foi realizada a extração de DNA genômico da cultura de MSC *gfp*<sup>+</sup>, tecido ósseo fresco de animais *gfp*<sup>-</sup> (controle negativo) e de uma amostra parafinizada contendo o tecido ósseo da região do defeito e transplante celular, conforme o protocolo do kit<sup>30</sup>. As amostras incluídas em parafina foram desparafinizadas e reidratadas previamente às etapas de extração de DNA, segundo protocolo descrito por Nascimento *et al.* (2003).

**Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** a PCR foi realizada visando a amplificação de um fragmento de 225 pares de base (bp) do gene *gfp* utilizando os *primers*: *GFP-5C* 5' ACT TCA AGA TCC GCC ACA ACA T 3' (direto) e *GFP-3C* 5' TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC 3' (reverso) [Coura, comunicação pessoal]<sup>31</sup>, com o objetivo de verificar a presença do gene *GFP* nas amostras de tecido. A reação foi desenvolvida em um volume final de 25,0 $\mu$ L contendo os seguintes reagentes: 7,0 $\mu$ L de DNA da amostra; 2,5 $\mu$ L do *primer GFP-5C* a 0,02mM; 2,5 $\mu$ L do *primer GFP-3C* a 0,02mM;

<sup>28</sup> Software de análise de imagens Imagelab Próplus<sup>®</sup>, Média Cybernetics, Bethesda, MD, USA

<sup>29</sup> Sistema para Análises Estatísticas<sup>®</sup> SAEG v. 9.1, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>30</sup> QIAamp DNA Mini Kit (250), QIAGEN, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>31</sup> Coura, R. Comunicação pessoal. Porto Alegre, RS. UFRGS. Março de 2009.

2,5µL de cada dNTP a 2,0mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 2,5µL de tampão da Taq DNA polimerase 1x e 1U de Taq DNA polimerase<sup>32</sup>. A PCR foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por ciclos de três etapas: desnaturação a 94°C por 35 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72° por 1 minuto, num total de 40 ciclos. Uma etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados em solução de brometo de etídeo para visualização em transluminador.

## RESULTADOS

Na inspeção diária, durante todo o período pós-operatório, não foram observadas perdas de peso, apatia, sinais de infecção ou de lesões neurológicas nos animais do estudo.

Na avaliação macroscópica, independentemente do grupo experimental, não foi observado crescimento ósseo fora das margens receptoras e nem abaixo da meninge. Também foi constatada ausência de fechamento total dos defeitos até o período final de avaliação e de aderências entre cérebro, meninges e tecidos de reparação.

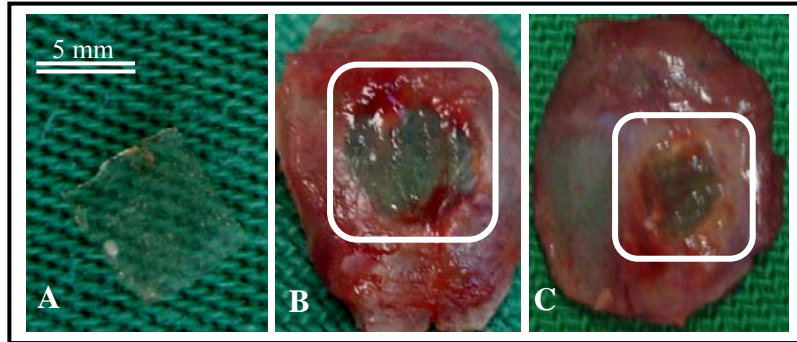
Observou-se, tanto em GC quanto em GMP, que o osso novo de preenchimento do defeito apresentava espessura inferior ao osso receptor circunvizinho e que ao longo dos períodos de avaliações, as bordas perdiam suas características de perímetros circulares, tornando-se irregulares, nos locais de maior preenchimento.

A membrana desmineralizada depositada acima de todos os defeitos (Fig. 1A) ainda estava presente em dois animais do GC, aos 10 dias de avaliação, e não estava presente no GMP. Essa membrana não foi observada nos demais períodos.

Ainda, macroscopicamente, foi observado, nos animais de ambos os grupos, um tecido transparente e delgado, cobrindo o defeito, com aparência de tecido cicatricial, acima da área ainda não reparada com tecido ósseo (Figs. 1B e 1C). Apenas em dois animais do GC, um avaliado aos 10 e outro aos 30 dias esta cobertura não estava completa.

---

<sup>32</sup> Taq DNA polimerase, Invitrogen Co, Carlsbad, CA – USA.



**Figura 1** – Fotografia do aspecto macroscópico da membrana desmineralizada e das falhas ósseas observadas aos 10 dias de pós-operatório. A) Membrana transparente. B) Região parietal do crânio de camundongo do grupo controle. C) Região parietal do crânio de camundongo do grupo MSC/PRP. Em B e C, destaque para a área do defeito ósseo, com bordas irregulares e o tecido transparente e delgado recobrendo a falha.

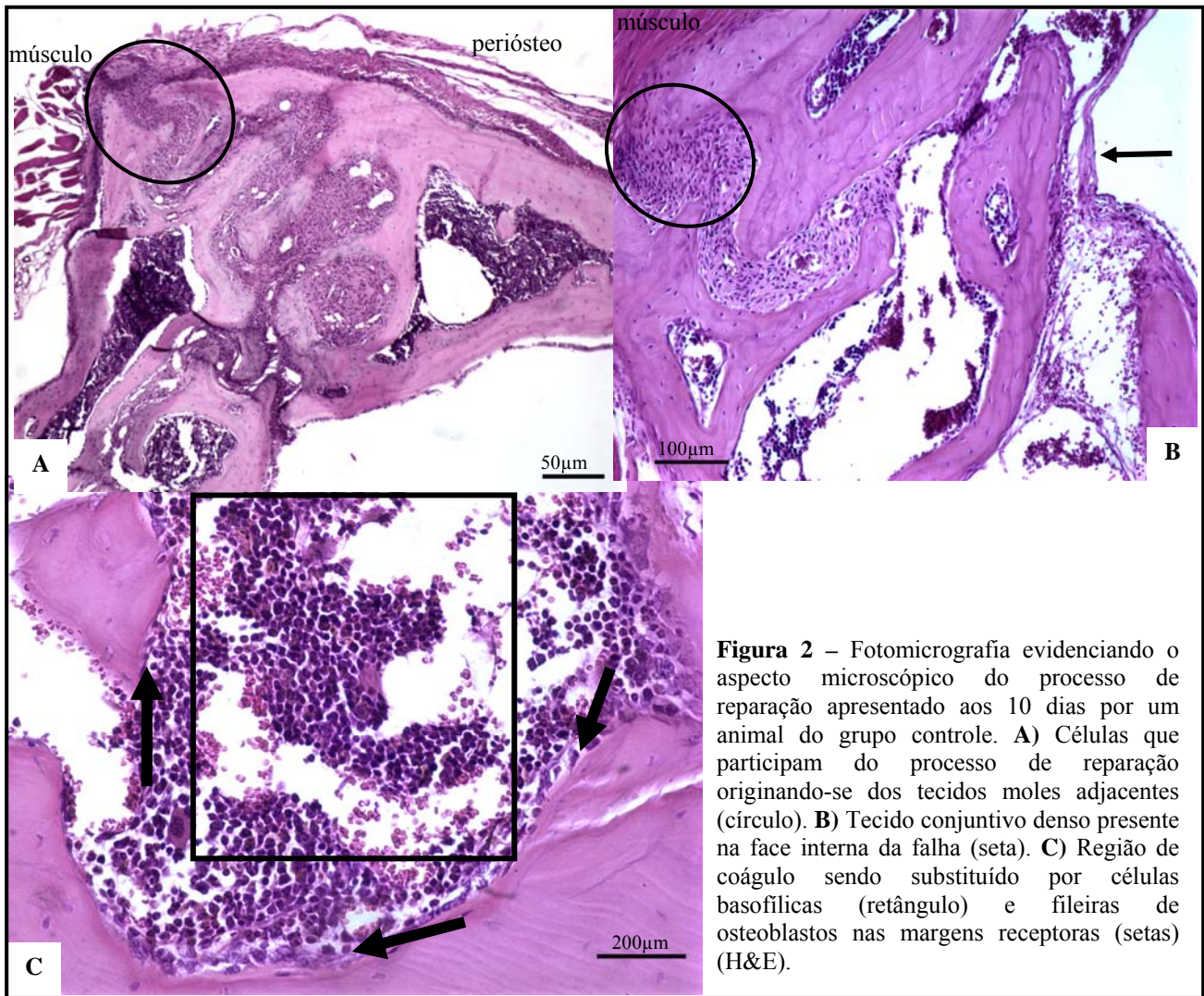
Por meio da análise da variável percentual de reparação óssea verificou-se diferença ( $p = 0$ ) entre os dois grupos experimentais em todos os períodos de avaliação e que os animais do GMP apresentaram os melhores valores de reparação. Os valores desse percentual no GMP, aos 10 dias, só foram observados no GC próximo ao período de 60 dias. Ainda no GMP, o percentual de reparação ocorrido do dia inicial da lesão até os 10 primeiros dias foi o maior encontrado (57%), e foi diminuindo ao longo dos dias (dia 11 ao 30, 6%; dia 31 ao 60, 6%; dia 61 ao 90, 0,3%). No GC o maior percentual foi verificado entre os dias 11 e 30 (30%) e o valor observado aos 90 dias foi semelhante ao exibido aos 30 dias no grupo tratado. A tabela 1 apresenta os valores do percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais agrupados nos grupos controle e tratado com MSC/PRP e os valores de  $p$  oriundos do estudo estatístico.

**Tabela 1** - Percentual médio de reparação óssea exibido por período de observação, para os animais dos grupos controle e tratado com MSC/PRP (Tratamento 1= grupo controle. Tratamento 2 = grupo MSC/PRP) e os valores de *p* calculados confrontando dados da % de preenchimento ósseo, por período, do tratamento 2 *versus* tratamento 1.

<b>Tratamento</b>	<b>Período (dias)</b>	<b>Médias das áreas (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Percentual de reparação óssea (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Valor de <i>p</i> calculado</b>
GC	10	22,133	21,880	<i>p</i> = 0,0007
GMP	10	11,926	57,906	
GC	30	13,863	51,069	<i>p</i> = 0,0000
GMP	30	10,452	63,179	
GC	60	11,843	58,199	<i>p</i> = 0,0000
GMP	60	8,767	69,056	
GC	90	10,495	62,957	<i>p</i> = 0,0000
GMP	90	8,666	69,413	

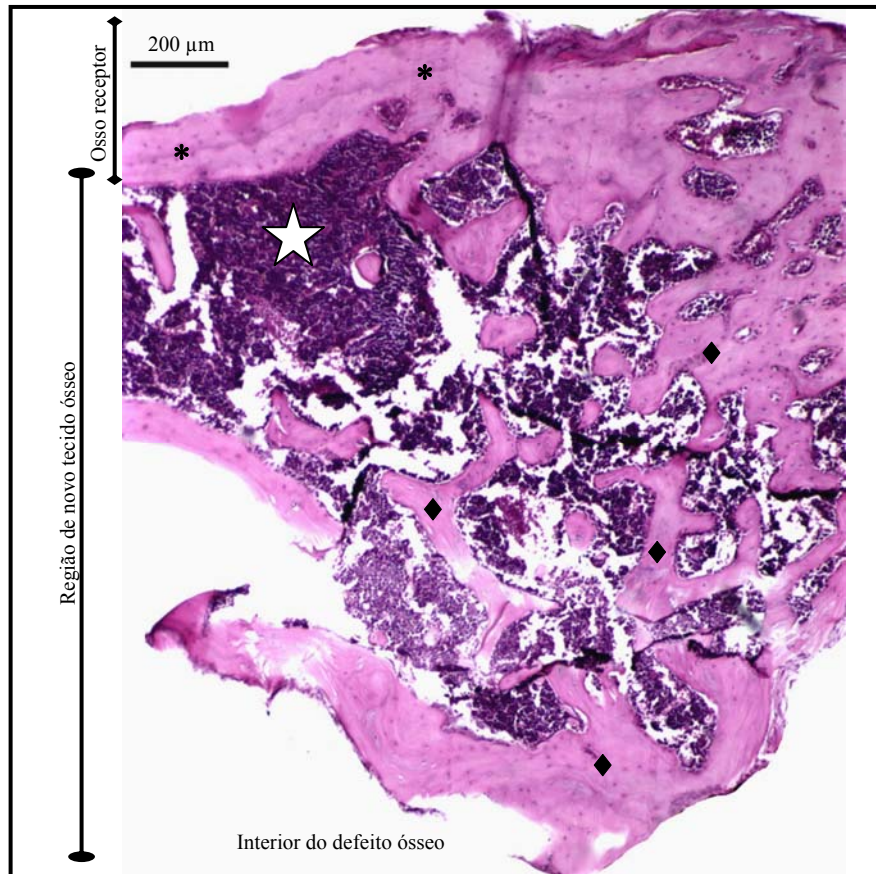
Os exames realizados sob microscopia de luz revelaram que o tecido transparente e delgado, que recobria os defeitos em GC e GMP, estava constituído de tecido conjuntivo denso com diferentes graus de celularidade e não continha células inflamatórias.

No **grupo controle**, aos 10 dias, observou-se multiplicação celular com discreta formação óssea nas bordas do defeito e em direção ao centro. Foi verificada a presença de infiltrado celular constituído por células basofílicas, substituindo a região anteriormente ocupada pelo coágulo sanguíneo. A maioria das células que participavam do processo de reparação originaram-se, principalmente, dos tecidos moles (periósteo e musculatura) presentes nas extremidades do defeito (Fig. 2).



**Figura 2** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo controle. **A)** Células que participam do processo de reparação originando-se dos tecidos moles adjacentes (círculo). **B)** Tecido conjuntivo denso presente na face interna da falha (seta). **C)** Região de coágulo sendo substituído por células basofílicas (retângulo) e fileiras de osteoblastos nas margens receptoras (setas) (H&E).

Aos 30 dias, em algumas amostras, percebeu-se maior formação óssea em comparação ao período anterior, com o novo tecido dispondo-se em ilhas circundadas por tecido de granulação e insinuando-se para o interior de defeito (Fig. 3). Nesse momento, os vasos sanguíneos de permeio ao tecido de granulação estavam presentes em quantidade superior à observada aos 10 dias.



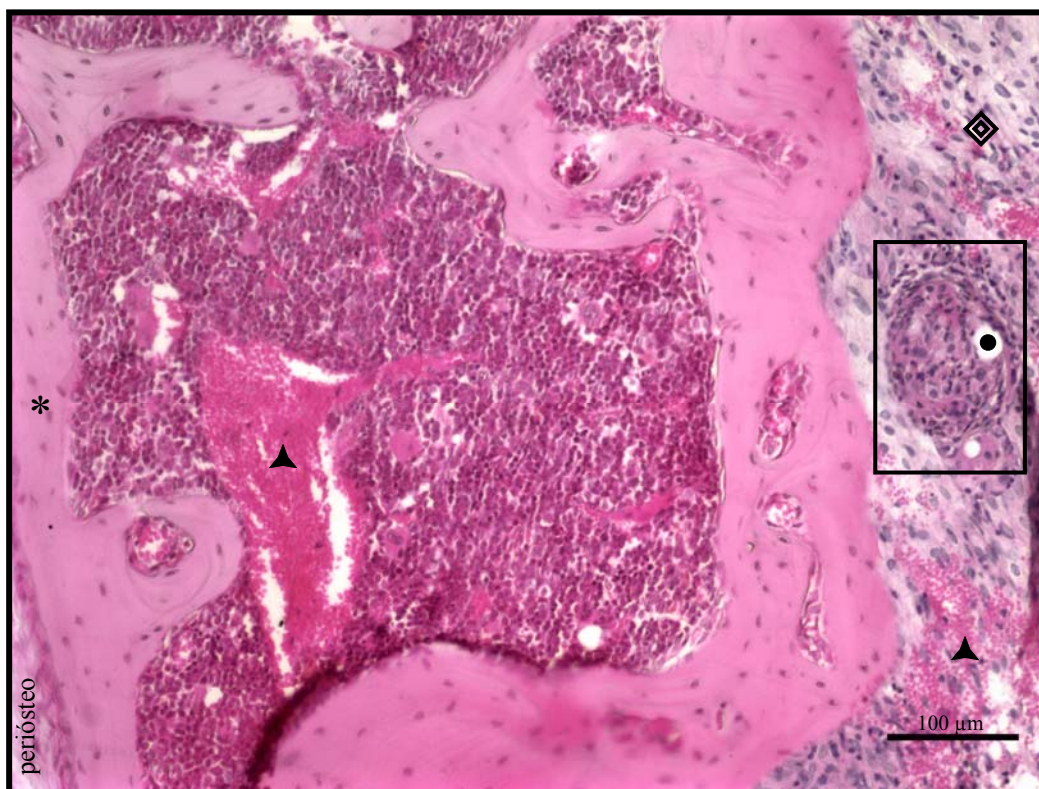
**Figura 3** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo controle. Região de reparação com formação de novo tecido ósseo (◆), rodeado por células basofílicas (☆) e se insinuando para o interior da falha a partir do osso do receptor (\*) (H&E).

Aos 60 e 90 dias o crescimento ósseo foi progressivo em relação ao tempo de observação, com presença de medula óssea com células mononucleares entremeando a díploe óssea. Foi visualizada presença de células grandes, arredondadas, com citoplasma eosinofílico e núcleo basofílico sugestivas de megacariócitos.

No **grupo MSC/PRP (GMP)**, foi observada maior angiogênese com vasos mais calibrosos do que a visualizada no GC. Esses vasos sanguíneos se concentravam, principalmente, nas margens receptoras, região da formação de novo tecido ósseo e a quantidade desses novos vasos foi superior aos 10 dias quando comparado aos demais períodos no mesmo grupo.

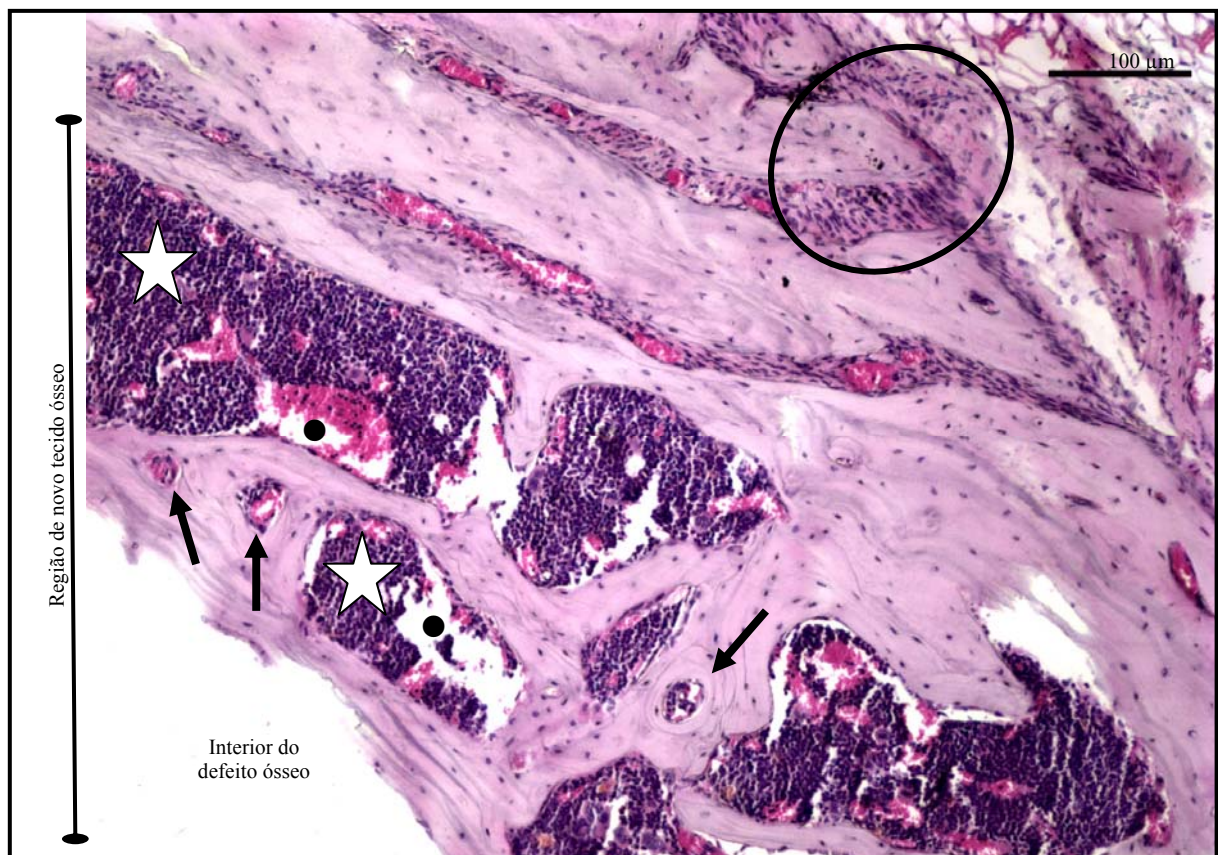
No GMP também foi visualizado um tecido de granulação e infiltrado inflamatório constituído de células basofílicas (Fig. 4), substituindo a região que ocupada pelo coágulo sanguíneo, similar ao observado no GC.

Aos 10 dias, a área de formação de novo osso, assim como observado macroscopicamente, foi superior à encontrada no GC e, ampliava-se à medida que os períodos de avaliação avançavam. Também, foi evidenciada intensa movimentação celular originada dos tecidos moles adjacentes ao defeito em direção ao centro, e presença de tipos celulares indiferenciados, com morfologia cubóide e núcleos arredondados, ocupando o interior do defeito e em contato com as margens receptoras (Fig. 4. Nessa época de avaliação também foi possível identificar início de organização das células presentes no interior do defeito em torno de vasos sanguíneos (Fig. 4).



**Figura 4** – Fotomicrografia evidenciando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 10 dias por um animal do grupo MSC/PRP. Presença de grande quantidade de células indiferenciadas no interior da falha (◊), início de organização das células presentes no interior do defeito (retângulo) em torno de um vaso sanguíneo, substituição do coágulo sanguíneo (▲), osso receptor (\*). (H&E).

Aos 30 dias, foi observada maior formação de novo osso em direção ao centro do defeito (Fig. 5), com grau de organização superior ao verificado aos 10 dias, período de avaliação anterior. Ainda foram visualizadas células indiferenciadas e fibroblastóides no interior do defeito, se mobilizando entre essas novas formações, e quantidades marcante de vasos sanguíneos congestionados, recém formados, de permeio às novas formações.



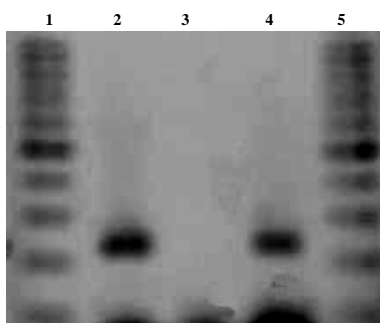
**Figura 5** – Fotomicrografia demonstrando o aspecto microscópico do processo de reparação apresentado aos 30 dias por um animal do grupo MSC/PRP. Movimentação celular oriunda da região de tecidos moles adjacentes (círculo), presença de células basofílicas (☆), vasos sanguíneos (●), osteons em formação (setas) (H&E).

Aos 60 dias, identificou-se presença de maior quantidade de tecido ósseo e mais organizado, do que até então tinha sido observado. De forma análoga à descrita nos períodos anteriores, verificou-se células indiferenciadas e jovens próximas as formações de osso novo. No interior dos vasos sanguíneos neoformados foram visualizadas células gigantes de núcleo basofílico e citoplasma eosinofílico, sugestivas de megacariócitos. O

que diferenciou os aspectos histológicos, aos 90 dias, foi a maior formação óssea e organização do tecido osteóide em ósteon.

Independentemente do período em análise, foram observados osteoblastos cubóides enfileirando-se nas margens da nova formação tecidual e aumento da matriz óssea. No GMP, verificou-se maior quantidade de osteoblastos e organização do tecido osteóide quando comparado ao GC. Também, com o avançar do tempo, foram visualizados discretos focos com sinais de remodelação óssea e presença de osteoclastos.

A amostra derivada do tecido que foi tratado com MSC/PRP apresentou o fragmento de DNA amplificado conforme tamanho esperado e exibiu a marcação de banda em gel de agarose 1,5% (Fig. 6). O seqüenciamento dos produtos da PCR ainda está sendo aguardados.



**Figura 6** – Fotografia do gel de agarose exibindo o bandejamento das amostras submetidas a PCR. Canaleta 1 e 5 contendo marcador padrão de 100 pares de base. Canaleta 2 contendo produto da PCR das células em cultura (controle positivo). Canaleta 3 contendo produto da PCR da amostra de tecido ósseo de animal *gfp*<sup>-</sup> (controle negativo). Canaleta 4 contendo produto da PCR da amostra de tecido ósseo parafinizado de um animal tratado com MSC *gf*<sup>+</sup>/PRP.

## DISCUSSÃO

Alguns estudos *in vivo* têm avaliado a eficácia da combinação de células-tronco mesenquimais (MSC) e plasma rico em plaquetas (PRP) na cicatrização de defeitos realizados no tecido ósseo, sugerindo que a associação apresenta efeito positivo no processo de reparação (Ogino *et al.*,2006; Pieri *et al.*,2009). Desta forma, no presente estudo, o PRP, uma fonte autóloga de fatores de crescimento, foi associado com células-tronco mesenquimais objetivando aumentar a proliferação e diferenciação dessas células indiferenciadas e a obtenção de reparação óssea mais precoce e eficaz.

As características específicas das MSC, incluindo seu potencial proliferativo e a habilidade de se diferenciar em diversos tipos de células e tecido, como ósseo, adiposo e cartilagem, tornaram esse grupo celular uma ferramenta atrativa para a medicina regenerativa (Deans & Moseley, 2000; Muraki *et al.*, 2006). Assim sendo, o transplante dessas células para o tratamento de defeitos críticos na calvária, região de difícil reparação, foi a opção terapêutica realizada nesse estudo.

Ademais, considerando-se que os processos de cicatrização do organismo são complexos e que necessitam de interações entre o local lesado e as células reparadoras, objetivou-se que as MSC transplantadas incrementassem o processo de reparação óssea por liberarem diferentes tipos de fatores de crescimento solúveis incluindo G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos), M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos), TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) e diversas interleucinas (IL-1,6,7,8,11,12,14,15), como o descrito por Deans & Moseley (2000) e Bobis *et al.*(2006). Esses fatores solúveis são capazes de ativarem diferentes tipos celulares, incluindo células envolvidas no processo de inflamação, promoverem a diferenciação das células osteoprogenitoras e induzirem a ativação de células ósseas jovens, acarretando em formação óssea mais precoce e em maior quantidade, verificada no grupo tratado.

Além de toda a contribuição providenciada pelas MSC, o PRP também é considerado uma fonte rica em fatores de crescimento (Marx, 2004) e agente estimulador da formação de novo tecido ósseo. Esses são liberados pela ativação e degranulação das plaquetas e são capazes de se ligarem a receptores de membrana expressos pelas células mesenquimais, acarretando a ativação de proteínas endógenas com conseqüente indução da proliferação celular, formação de matriz, síntese de colágeno e maior formação óssea. De acordo com dados apresentados por Ball *et al.*(2007) as MSC expressam elevados níveis de receptores para PDGF e VEGF, o que pode explicar, entre outros fatores, a exuberante angiogênese encontrada no GMP.

A presença de PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) apresenta numerosos efeitos positivos na reparação de tecidos incluindo angiogênese, mitogênese de células da medula óssea e de pré-osteoblastos e a ativação da diferenciação de

osteoblastos maduros que estimulam a deposição de proteínas na matriz óssea (Marx, 2004; Khojasteh *et al.*, 2007).

Verificou-se que as MSC/PRP utilizadas como tratamento dos defeitos na porção parietal do crânio dos camundongos determinaram maior formação óssea em relação ao grupo controle, com tendência a reparação total, contudo, ao final do período de avaliação aos 90 dias, os defeitos não estavam totalmente preenchidos. Tal característica evidencia a criação de um defeito crítico na calvária do camundongo (6,0 mm), concordando com dados disponíveis na literatura que consideram críticos os defeitos com diâmetro superior a 2,7mm (Seo *et al.*, 2008). Conseqüentemente, por mais que o tratamento com as células indiferenciadas e plasma em gel tenha incrementado o processo de reparação, ele não foi suficiente para prover a cura total.

O estudo estatístico confirmou que o tratamento com a associação MSC/PRP incrementou a reparação óssea que acarretou maior quantidade de novo tecido ósseo, sobretudo nos 10 primeiros dias após o tratamento, fase mais precoce. Ademais, permitiu verificar que a maior taxa de reparação óssea exibida no grupo controle aos 90 dias foi semelhante à taxa do grupo tratado aos 30 dias. Por esses dados, pode-se inferir que liberação dos fatores de crescimento, providenciada pelas MSC e pelo PRP, determinou maior ativação de receptores nas células osteoprogenitoras, maior recrutamento celular e ativação de células osteocomprometidas, com conseqüente maior formação de tecido ósseo.

A membrana cortical desmineralizada reabsorvível, utilizada acima dos defeitos em ambos os grupo, teve a finalidade de evitar a dispersão do material depositado no interior da lesão uma vez que o camundongo não possui musculatura e tecido subcutâneo, nessa região da calvária, em quantidade suficiente para serem suturadas e impedir o extravasamento das células que foram utilizadas no tratamento. Na avaliação realizada aos 30 dias em ambos os grupos, ela não estava mais presente concordando com os dados do estudo piloto preliminar, realizado pelos autores, que constatou que ela não influencia o processo de reparação óssea, sendo totalmente reabsorvida num período de 15 dias.

No GMP foi visualizada, no período inicial de avaliação, uma marcante presença de infiltrado inflamatório contendo células basofílicas e com base em afirmações

prévias (Deans & Moseley, 2000; Bobis *et al.*, 2006) é possível inferir que essas células possam ter sofrido influência quimiotática dos fatores solúveis liberados no meio, explicando essa maior quantidade de células. Para Honma *et al.* (2008), o processo inflamatório desencadeado pelo procedimento cirúrgico pode ter iniciado e mantido a diferenciação das MSC em osteoblastos. De forma análoga, Lacey *et al.* (2009) demonstraram o potencial de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), influenciando positivamente o potencial osteogênico por favorecer a produção de osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do fator  $\kappa$ B nuclear (RANKL), duas citocinas que atuam nos processos de deposição e reabsorção óssea.

Com o avançar dos períodos de observação, à medida que a formação óssea foi se consolidando e a atividade dos osteoblastos e das células osteoprogenitoras foi diminuindo, observou-se, concomitantemente, redução do processo inflamatório. Pode-se inferir que a liberação de citocinas pró-inflamatórias também regrediu uma vez que é dependente do processo inflamatório e dos fatores solúveis consumidos durante a reparação. Também nessa fase não havia necessidade de prover tantos estímulos para as células osteogênicas.

No primeiro período de avaliação, aos 10 dias, foi observada no GMP a presença de grande quantidade de células indiferenciadas de morfologia ora cubóide ora fibroblastóide, no interior do defeito, se organizando ao redor de vasos sanguíneos e iniciando a formação do novo tecido ósseo. Este evento não foi visto no GC possivelmente porque as células observadas foram as MSC empregadas no tratamento e/ou células indiferenciadas quimioatraídas pelos fatores solúveis liberados no meio. Aos 30, 60 e 90 dias também foram visualizadas células indiferenciadas fibroblastóides de permeio aos novos crescimentos ósseos, contudo a morfologia era diferente das células observadas aos 10 dias. Possivelmente, aos 10 dias, as células presentes eram as transplantadas e aos 30, 60 e 90 dias as células indiferenciadas eram as que foram atraídas para o local de reparação.

Outro achado de destaque na avaliação microscópica foi uma intensa movimentação celular oriunda dos tecidos moles adjacentes para o centro do defeito, principalmente no GMP, demonstrando a contribuição das células osteocomprometidas

presentes no periósteo com o processo de reparação. Shimizu *et al.* (2001) já haviam demonstrado que dentre as células que constituem o periósteo existem células progenitoras com potencial de se diferenciar em osteoblastos, que são ativadas por estimulação física ou química, como nos casos de fraturas, inflamações e desenvolvimento de tumores, e que contribuem para os processos de reparação. Com o mesmo intuito, Zhang *et al.* (2005) afirmaram que além da função de proliferação e diferenciação em células cartilagosas e ósseas, as células mesenquimais progenitoras, que estão presentes no periósteo, também liberam fatores osteoindutores capazes de recrutar e ativar as demais células osteocomprometidas do hospedeiro.

No GMP também observou-se maiores angiogênese e formação de novo tecido ósseo em relação ao GC. A formação óssea reflete a presença de maior quantidade de osteoblastos, que podem ter-se originado por diferentes mecanismos de diferenciação das células precursoras mesenquimais (Herzog *et al.*, 2003; Meirelles *et al.*, 2006) e/ou terem sido atraídos para o local da defeito por efeito parácrino (Moore & Quesenberry, 2003). Uma vez presente nas margens da lesão, essas células osteogênicas secretam matriz protéica óssea, incluindo colágeno tipo I e proteoglicanos e estimulam a mineralização (Shen *et al.*, 2005; Bobis *et al.*, 2006).

O número intenso de osteoblastos no grupo GMP provavelmente refletiu a ação dos fatores de crescimento liberados pelo PRP que recrutaram células osteocomprometidas como o processo de reparação e favoreceram a ativação e diferenciação das células indiferenciadas que foram transplantadas, sobretudo nos primeiros dias pós-transplantes. Khojasteh *et al.* (2007) ressaltaram a importância do PDGF no recrutamento de células osteocomprometidas e, afirmaram que embora o PDGF secretado inicialmente pelas plaquetas desempenhem importante papel na cicatrização inicial, é a sua posterior secreção a partir dos macrófagos recrutados (presente no tecido de granulação) que providencia uma “up-regulação” de demais fatores de crescimento, angiogênese e recrutamento e ativação de células como fibroblastos e osteoblastos.

Em relação à formação óssea, os tipos celulares presentes em ambos os grupos foram os mesmos. Observou-se osteoblastos cubóides, dispostos em fileiras nas bordas da nova formação óssea e discreta presença de osteoclastos próximos aos novos vasos

sanguíneos que se formavam. A diferença entre os grupos foi a quantidade de células de deposição óssea, maior no GMP. Corroborando as afirmações de Kasten *et al.* (2008a), a adição dos fatores de crescimento do plasma resultou em efeito positivo para a maior ativação e proliferação das MSC.

Ao se avaliar as contribuições das terapias reparativas com MSC é imprescindível considerar a característica do local onde as células serão depositadas. De acordo com Fuchs *et al.* (2004), o sucesso terapêutico é dependente do nicho, ou seja, as interações das células-tronco com as demais células, com a matriz extracelular (MEC) e com os fatores de crescimentos do meio, que manterão essas células quiescentes e/ou em processos de diferenciação. Dessa forma, a criação das feridas de forma cirúrgica e asséptica, a aplicação das células num momento agudo do processo de lesão (janela terapêutica) e a associação com o PRP atuando como uma fonte de liberação de outros fatores de crescimentos e como uma plataforma limitando a dispersão das células, favoreceram a adesão, manutenção, diferenciação e liberação de demais fatores solúveis por parte das MSC, contribuindo para a formação superior de tecido ósseo no GMP.

Cheng *et al.* (2008) realizaram estudos em defeitos críticos em crânio de coelhos utilizando o PRP como veículo carreador de células mesenquimais originadas da medula óssea. De forma análoga ao presente estudo, os autores supracitados não encontraram total reparação óssea dos defeitos durante o período de observação de 12 semanas, porém concluíram que o PRP em gel é um promissor veículo para a aplicação de MSC, por fornecer os fatores solúveis que contribuem para a osteogênese e adequada nutrição para as células.

A presença de banda no gel de agarose detectada no animal tratado pela associação MSC/PRP, similar à verificada no controle positivo (próximo à 225 pb) comprova a presença do gene repórter nos animais tratados com MSC *gfp*<sup>+</sup> e nos permite inferir que as células-tronco utilizadas no tratamento permaneceram presentes no processo de reparação óssea.

## CONCLUSÃO

Sob as condições nas quais foram desenvolvidas o experimento, constata-se por meio das avaliações macroscópicas, estatísticas, microscópicas e moleculares que a

associação das células-tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 *gfp*<sup>+</sup> com o gel autólogo de PRP aplicada em defeitos ósseos críticos produzidos em calvária de camundongos C57BL/6 jovens contribui positivamente para o processo de reparação óssea.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro; à equipe do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, às equipes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infeciosos e Parasitários e Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores da Universidade Federal de Viçosa pelo suporte técnico.

## **REFERÊNCIAS**

- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, v.91, p.4–15, 2004.
- BALL, S.G.; SHUTTLEWORTH, C.A.; KLELTY, C.M. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.11, p. 1012-1030, 2007.
- BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L. et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.1, p.22-24, 2006.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopedics Research**, v.9, p.641-650, 1991.
- CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p. 318-324, 2009.

CHENG, X.; LEI, D.; MAO, T. et al. Repair of critical defects with injectable platelet-rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v. 14, p.87-95, 2008.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, p. 875-884, 2000.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. **Cell**, v. 116, p.769–778, 2004.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.

HONMA, T.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA, M. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Diseases**, v.14, p. 457-464, 2008.

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

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, F. et al. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v.29, p. 3983-3992, 2008b.

KHOJASTEH, A.; ESLAMINEJAD, M.B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.106, p. 356-362, 2007.

LACEY, D.C.; SIMMONS, P.J.; GRAVES, S.E. et al., Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation, **Osteoarthritis and Cartilage**, 2009. doi:10.1016/j.joca.2008.11.011

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 85, p. 638-46, 1998.

MARX, R.E. Platelet-Rich Plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, v.123, p.702-711, 2003.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, n.119, p.2204-2213, 2006.

MEIRELLES, L.S; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p. 2287-2299, 2008.

MOORE, B.E.; QUESENBERRY, P.J. The adult hemopoietic stem cell plasticity debate: idols vs new paradigms. **Leukemia**, v.17, p. 1205-1210, 2003.

MURAKI, K.; HIROSE, M.; KOTOBUKI, N. et al. Assessment of viability and osteogenic ability of human mesenchymal stem cells after being stored in suspension for clinical transplantation. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 1711-1719, 2006.

NARDI, N.B; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p.249-282, 2006.

NASCIMENTO, E.M; SPINELLI, M.O; RODRIGUES, C.J. et al. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Rio de Janeiro**, v. 39, p. 253-255, 2003.

OGINO, Y.; AYUKAWA, Y.; KUKITA, T. et al. The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta1, and insulin-like growth factor-I in

platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v.101, p.724-729, 2006.

PIERI, F.; LUCARELLI, E.; CORINALDESI, G. et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, p.265-272, 2009.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p. 143-147, 1999.

RIBEIRO-JÚNIOR, J.I; MELO, A.L.P. Guia prático para a utilização do SAEG. Viçosa: Folhas Artes Gráficas. 2009.288p.

SEO, B.M.; SONOYAMA, W.; YAMAZA, T. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Diseases**, v.14, p. 428-434, 2008.

SHEN, F.; RUDDY, M.J.; PLAMONDON, P. et al. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17 and TNF- $\alpha$  induced genes in bone cells. **Journal of leukocyte Biology**, v. 77, p. 388-399, 2005.

SHIMIZU, T.; SASANO, Y.; NAKAJO, S. et al. Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by physical contact with the bone matrix in vivo. **Anatomical Record**, v.264, p. 72-81, 2001.

SILVA, P.S.A; DEL CARLO, R.J; SERAKIDES, R. et al. Plasma rico em plaquetas (PRP) associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v.39, p.129-134, 2009.

VAN DEN DOLDER, J.; MOOREN, R.; VLOON, A.P.G. et al. Platelet-Rich Plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. **Tissue Engineering**, v. 12, p. 3067-3073, 2006.

ZHANG, X.; XIE, C.; LIN, A.S.P. et al. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.20, p.2124-2137, 2005.