

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E FRAGMENTOS ÓSSEOS
LIOFILIZADOS: DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO DE CULTIVO

Autor: Fabiany da Costa Gonçalves

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

Co-orientadora: Dra. Ana Helena da Rosa Paz

PORTO ALEGRE

2010

ARTIGO

Stem Cells and Development

Título: Associação de células-tronco mesenquimais e fragmentos ósseos liofilizados: desenvolvimento de um método alternativo de cultivo

Autores: Fabiany da Costa Gonçalves¹, Ana Helena Paz¹ e Elizabeth Cirne-Lima¹

¹Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisas UFRGS- HCPA, 90035-903, Porto Alegre, RS-Brasil

Título breve: Co-cultivo de células-tronco mesenquimais e ossos liofilizados

Endereço de Correspondência: Elizabeth Cirne-Lima

Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular- Centro de Pesquisas HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS-Brasil

Tel: + 55 51 3359 8989

Fax + 55 51 3359 8761

Email: elizabethcirnelima@gmail.com

Resumo

A perda óssea tem levado ao desenvolvimento de estratégias de substituição do tecido ósseo doente por um enxerto capaz de se integrar ao tecido saudável. Estudos realizados demonstram a capacidade de células-tronco mesenquimais (MSCs) modularem a regeneração do tecido ósseo lesionado. Embora existam resultados experimentais relacionados ao efeito de MSCs em associação com enxertos ósseos, pouco foi publicado sobre métodos de co-cultivo. O presente trabalho propôs uma análise *in vitro* para avaliar a integração entre MSCs co-cultivadas e fragmentos de ossos liofilizados (FOLs) em dois diferentes métodos de cultivo: co-cultivo convencional e co-cultivo rotatório. Propomos o co-cultivo dinâmico de MSCs com enxertos ósseos como novo método de associação, a fim de estabelecer uma melhor interação entre células e FOLs. No experimento, as culturas permaneceram a 37°C por 24h em método convencional ou rotatório. Nos dias 1, 3 e 6 após os co-cultivos, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Azul de Trypan. No dia 0, os FOLs foram removidos e processados para análise histológica. A técnica de crescimento celular no FOL em estufa rotatória possibilitou maior adesão e proliferação celular no biomaterial, quando comparada ao cultivo convencional. As células que não aderiram na superfície óssea organizaram-se em aglomerados celulares esférico. Dessa forma, foi desenvolvido um método alternativo de cultivo rotatório de MSCs com biomaterial, demonstrando que este sistema proporciona superior capacidade das células de se fixarem no enxerto e, provavelmente, aumenta a eficiência do uso de terapia celular associada com enxertos ósseos em cirurgias de reparação óssea em modelo animal.

Introdução

Diversos métodos têm sido estudados para a restauração de defeitos ósseos resultantes de processos traumáticos, ressecções tumorais, doenças degenerativas e deformidades congênitas (1). Acredita-se que o sucesso do tratamento de perda óssea requer uma combinação de sinais osteoindutivos, de matriz osteocondutiva e de resposta celular ao potencial osteogênico (2). A maior necessidade clínica é o desenvolvimento de estratégias de substituição do tecido ósseo doente por um enxerto capaz de se integrar ao tecido saudável (3). Nesse sentido, os enxertos ósseos autógenos possuem a capacidade de formar um novo osso e servem como um *scaffold* na reparação dos tecidos regenerados. Entretanto, a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes, pois a quantidade de enxerto autógeno pode não ser suficiente para a reparação de grandes defeitos ósseos. Além disso, o sitio doador é frequentemente fonte de morbidade, incluindo riscos de infecção, hematoma, dor, irritabilidade e hipersensibilidade do tecido. Os enxertos alógenos, por sua vez, possuem fornecimento limitado devido à escassez de tecidos, adquiridos de doadores cadáveres ou com membros amputados (2, 4-7). Em busca de um substituto ósseo adequado, o enxerto ósseo xenógeno tem sido uma opção viável, desde que tratado adequadamente para redução da antigenicidade. O enxerto ósseo bovino liofilizado tem sido usado como enxerto ósseo em humanos e apresenta osteointegração similar ao enxerto liofilizado humano (8). Esses enxertos apresentam como vantagem a fácil obtenção e a grande quantidade de material disponível para enxertia.

A fim de diminuir a antigenicidade e o risco de transmissão de doenças, a técnica de liofilização óssea tem se tornado um método eficiente na preservação do tecido ósseo. A liofilização consiste na retirada de gordura e posterior desidratação do osso. Entre suas vantagens estão a praticidade no armazenamento e a baixa alteração bioquímica (7,9). Entretanto, as técnicas de esterilização diminuem as propriedades osteoindutivas desses enxertos (10,11). Nesse sentido, uma associação entre células-tronco e osso liofilizado poderia promover uma melhor regeneração óssea, já que estas possuem capacidade osteoindutiva.

A manutenção da estabilidade óssea é resultado de um equilíbrio controlado entre a atividade de formação (osteoblastos) e de reabsorção óssea (osteoclastos). As interações moleculares entre osteoblastos e osteoclastos são influenciadas pela ação de células precursoras da linhagem osteoblástica, as células-tronco mesenquimais (MSCs) (12). As MSCs possuem o potencial de se diferenciar em diferentes tecidos, incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão/ligamento, músculo, e tem recebido grande atenção devido ao seu potencial terapêutico na engenharia tecidual. Essas células-tronco adultas estão presentes na medula óssea e em diversos outros tecidos e apresentam grande plasticidade (5,13-15). Quando diferenciadas, têm a capacidade de estimulação autócrina e parácrina, a fim de produzir seu próprio *scaffold* e recrutar células para a formação do osso e sua vascularização (16). Um estudo realizado por Hayashi e colaboradores (17) sobre a capacidade de diferenciação osteogênica de MSCs da medula óssea, do perióstio e do tecido adiposo de ratos mostrou que as MSCs originadas da medula óssea e do perióstio apresentam um potencial superior de regeneração óssea. Além disso, MSCs apresentam baixa imunogenicidade e propriedades imunossupressivas

e podem reduzir a reação da doença enxerto –versus- hospedeiro em transplantes alogênicos (18-21).

Embora existam resultados experimentais demonstrando o efeito de MSCs em associação com enxertos ósseos, muito pouco foi publicado sobre métodos de co-cultivo (22,23). Não há consenso na literatura sobre o método, a quantidade ou o período de exposição das células aos enxertos para haver a adesão celular, além de não ter sido encontrado na literatura nenhum trabalho analisando histologicamente a presença de células nos *scaffolds* de osso liofilizado. Nesse sentido, o presente trabalho propôs uma análise *in vitro* para avaliar a integração entre MSCs co-cultivadas com fragmentos de ossos liofilizados em dois diferentes métodos de cultivo: método de co-cultivo convencional e método de co-cultivo rotatório. Propomos o co-cultivo dinâmico de MSCs com enxertos ósseos em estufa rotatória, a fim de estabelecer uma melhor interação entre células e fragmentos de osso liofilizado. Assim, por ação mecânica, as células poderiam aderir e proliferar com maior eficiência na superfície óssea.

Materiais e Métodos

Isolamento e Cultura de MSCs

O protocolo de isolamento, expansão *in vitro* e caracterização de MSCs foi realizado conforme o trabalho de Paz e colaboradores (24). A fração de medula óssea foi coletada de fêmur e tíbia de rato Wistar com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os animais ficaram em caixas plásticas 30x20x12cm forradas com maravalhas, com alternância de ciclos de 12h de claro e escuro, temperatura ambiente entre 18 e 25°C, e água e ração peletizada adequada *ad libitum*. Após o isolamento, 1×10^7 células da medula óssea foram cultivadas em frascos de cultura T25 (TPP, Schaffhausen, Switzerland) em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo baixa concentração de glicose (Invitrogen, CA, USA), suplementado com 15 mM HEPES, 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, CA, USA), e solução antibiótica de 100 units/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco, NM, USA) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Após 72h de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura celular apresentou confluência de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA) para posterior subcultivo em DMEM com 10% SFB (meio completo).

Ensaio de Diferenciação Celular *in vitro*

A fim de caracterizar as MSCs, foram realizados dois diferentes experimentos para a indução da diferenciação celular, de acordo com "*The International Society for Cellular Therapy Position Statement*" (25). Para a diferenciação osteogênica, utilizou-se meio de indução DMEM 15 mM HEPES, suplementado com 10^{-8} mol/L de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 5 µg/µL de Ácido Ascórbico 2-Fosfato (Sigma, MO, USA) e 10 mM/L de β-Glicerolfosfato (Sigma MO, USA)

em cultura de MSCs de até 21 dias. A diferenciação osteogênica foi detectada por coloração com Vermelho de Alizarina (Nuclear, SP, Brasil), que cora matriz extracelular rica em cálcio. Já para a diferenciação adipogênica, as MSCs foram cultivadas em DMEM 15 mM HEPES, 10^{-8} mol/L de Dexametasona (Sigma, MO, USA), 5 µg/mL de Insulina e 50 µg/mL de Indometacina (Sigma, MO, USA). A diferenciação adipogênica foi detectada 21 dias após o início do ensaio de diferenciação por coloração com Oil Red (Sigma, MO, USA), que cora os vacúolos de gordura.

Citometria de Fluxo

As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e aproximadamente 1×10^6 células foram preparadas para análise. As suspensões celulares foram transferidas para tubos cilíndricos estéreis e lavadas duas vezes com PBS por centrifugação $300 \times g$ por 5 minutos a 4°C. As células foram então ressuspensas em PBS e incubadas, por 20 minutos, a 4°C com os seguintes anticorpos: anti-CD45/FITC, anti-CD34/PE, anti-CD90/FITC, anti-CD11b/c/PE, anti-CD44/FITC e anti-CD29/PECy5. Anticorpos anti-IgG₁, -IgG_{2a} e -IgM conjugados com PE e FITC foram utilizados como controle de isotipo das imunoglobulinas dos anticorpos primários. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação. A suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo BD FACS-Calibur (Becton & Dickinson, NJ, USA), que possui um sistema com laser capaz de detectar até três fluorocromos excitados por 488nm. As amostras foram analisadas com os softwares Cellquest e PAINT-A-GATE.

Ossos Liofilizados

Foram utilizados fragmentos de ossos liofilizados (FOLs), de origem bovina, fornecidos pelo Banco de Tecidos do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA. O protocolo de liofilização consiste na retirada da gordura e posterior desidratação do osso, por meio de banhos químicos seguidos de lavagens e centrifugações. A última etapa consiste na liofilização a frio (-40°C) durante 7 dias. Ao final do processo, o material é empacotado em embalagens permeáveis a gás e esterilizado em autoclave. Para o experimento, o osso liofilizado foi fragmentado em volume aproximado de 45mm³ (Fig.1).

Verificação do pH do Meio de Cultura

Os FOLs foram mantidos em meio de cultura por 72h com o objetivo de verificar uma possível alteração do pH do meio. Alguns estudos relatam que os FOLs poderiam alterar o pH do meio de cultivo, fato este que prejudicaria a viabilidade das MSCs (22). Para a análise, o pH foi aferido nos dias 0, 1, 2 e 3 após o início do experimento.

Co-cultivo de MSCs e FOLs

MSCs foram co-cultivadas com FOLs por dois métodos de cultivo: método rotatório e método convencional. Em ambos os métodos, a cultura celular com FOL foi mantida em meio de cultura DMEM (Invitrogen, CA, USA), suplementado com 15 mM HEPES, 15% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) (Invitrogen, CA, USA), e solução antibiótica contendo 100 units/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco, NM, USA).

Além disso, foi utilizado Matrigel (BD, CA, USA) (diluição 1:1), um composto de matriz extracelular líquido a 4°C que se solidifica em temperatura ambiente, para facilitar a adesão celular ao enxerto. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada sistema de co-cultivo e para cada método de análise. Os grupos estudados foram os seguintes: (1) células e osso (CO); (2) Matrigel, osso e células (MOC); (3) osso (O); (4) células (C). Os grupos (3) e (4) serão utilizados como controles nos dois métodos de co-cultivo.

Método de Co-cultivo Rotatório (R): FOLs foram co-cultivados com MSCs em estufa incubadora rotatória, sem controle de umidade e fornecimento de CO₂ e, em tubos de culturas com superfície não aderente e fundo redondo, a 37°C em 160rpm por 24h. A cada tubo, foi adicionado um FOL e uma suspensão de 10⁶ células em 1,5 mL de meio de cultivo (Fig.2A). No grupo MOC, o Matrigel foi colocado previamente sobre a superfície óssea para se solidificar. Após, foi transferido para o tubo contendo meio de cultura e células.

Método de Co-cultivo Convencional (CV): FOLs foram co-cultivados com MSCs em placas de culturas de 24 poços com superfície aderente, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Dessa forma, por poço, foram colocados 1,5ml de meio de cultivo, contendo 10⁶ células, sobre cada fragmento ósseo para posterior sedimentação celular sobre a matriz óssea (Fig.2B). No grupo MOC, o Matrigel também foi colocado previamente sobre os FOLs.

Análise Histológica

Após 24h de co-cultivo de células e FOLs pelo método rotatório ou pelo método convencional, as matrizes ósseas foram fixadas em formalina por 24h e descalcificadas em ácido

nítrico 10% por 48h. O material foi processado e incluído em parafina para que, posteriormente, fossem obtidos cortes do tecido. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E), para análise histológica. Para análise quantitativa de adesão celular na superfície da matriz óssea foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, MA, USA). Para tal, foram quantificadas as células presentes em 9 campos microscópicos em aumento de 200x.

Análise da Multiplicação Celular pelo Método de Exclusão com Azul de Trypan

Após o co-cultivo realizado em estufa rotatória, os FOLs foram colocados em placas de cultura e permaneceram por 6 dias em estufa de CO₂, com o objetivo de quantificar as células presentes na superfície óssea em cultura prolongada não dinâmica. Nos dias 0, 3 e 6 após o cultivo em agitação, as células foram removidas da superfície óssea com solução de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco, NM, USA) e quantificadas em câmara de Neubauer, a fim de avaliar a taxa de replicação celular pelo método de exclusão com azul de Trypan, que cora apenas as células não viáveis. Além disso, foi realizado o co-cultivo de células e matriz óssea pelo método convencional nos mesmos períodos citados acima, utilizando-se o mesmo método para avaliação da viabilidade celular.

Análise Estatística

A avaliação da taxa de replicação celular foi realizada através da comparação entre as médias das amostras do sistema convencional e das amostras do co-cultivo rotatório ao longo do tempo. Realizamos análise estatística de variância (ANOVA) no programa estatístico GrafPad

Prism. Quando necessário, foi aplicado o teste de Tukey. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

Considerações Éticas

O presente projeto encontra-se em fase de conclusão e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o número 09-015.

Resultados

Expansão e Características Fenotípicas de MSCs

MSCs da medula óssea de ratos foram obtidas pelo plaqueamento da suspensão celular da medula óssea em placas de cultura e pela expansão de células aderentes. As células isoladas desenvolveram colônias de células fibroblastóides aderentes entre 7 a 10 dias após o início do plaqueamento. Com o tempo de cultura, as células foram se tornando morfológicamente homogêneas, devido à redução das células hematopoiéticas e de outras células estromais da medula óssea. MSCs de rato são positivas para CD44, CD90 e CD29 e negativas para CD34, CD45 e CD11bc. Na terceira passagem da cultura, a grande maioria das células expressaram os marcadores CD44 (99.3%), CD90 (99.8%), CD29 (99.5%) e apenas uma pequena proporção expressou os marcadores CD45 (0.9%), CD11b/c (0.52%) e CD34 (0.05%). De acordo com esses resultados, a população celular foi uniforme e pode ser considerada MSCs.

O potencial de diferenciação das MSCs foi avaliado através de protocolos de diferenciação adipogênica e osteogênica. Os resultados demonstraram os potenciais de diferenciação adipogênica, pela coloração com Oil Red dos vacúolos lipídicos, e osteogênica, pela coloração dos depósitos de cálcio com Vermelho de Alizarina (Fig. 3).

Verificação do pH do Meio de Cultura com Ossos

O objetivo foi avaliar se houve ou não alteração do pH do meio de cultura, quando FOLs eram mantidos em cultura. Assim, FOLs foram mantidos em cultura por 3 dias e o pH do meio de cultura foi aferido nos dias 0, 1, 2 e 3. Com estes experimentos, foi possível demonstrar que não houve variação significativa do pH do meio de cultura na presença dos *scaffolds* ósseos quando comparado ao pH do meio puro ao longo do tempo ($p=0.1423$), conforme dados da tabela (Tab.1).

Adesão Celular no Enxerto Ósseo

MSCs foram co-cultivadas com FOLs por dois métodos de cultivo: método convencional (CV) e método rotatório (R). Os ossos foram associados com Matrigel ou não. Dessa forma, após o co-cultivo, os FOLs foram fixados, descalcificados, processados e corados com H&E, para análise histológica da proliferação celular na superfície do enxerto. O grupo CO (R) apresentou maior quantidade de células aderidas na matriz óssea, quando comparado aos grupos MOC (R) ($p=0.0175$), CO (CV) ($p=0.0073$) e MOC (CV) ($p=0.0024$). A diferença entre os grupos foi

considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$ (Fig. 4 e Tab. 2). Não houve diferença estatística entre os grupos na utilização ou não do Matrigel.

Dessa forma, a técnica de crescimento celular no FOL em estufa rotatória possibilitou maior adesão e proliferação de múltiplas camadas celulares no biomaterial quando comparada ao método de cultivo convencional (Fig. 5).

Viabilidade Celular

Avaliamos a taxa de proliferação celular através do método de exclusão com azul de Trypan. Após o co-cultivo de 24h, pelo método convencional ou pelo método rotatório, as células foram removidas da superfície óssea e quantificadas. Os ossos co-cultivados com MSCs em estufa rotatória apresentaram maior proliferação celular nos *scaffolds* do que os co-cultivados pelo método convencional ($p=0.0272$). Após o co-cultivo em agitação por 24h, os FOLs foram mantidos em placa de cultura de 24 poços, a fim de verificar se as células permaneciam na superfície óssea por períodos mais prolongados em cultura não dinâmica. As mesmas análises foram realizadas no co-cultivo convencional. Desta forma, nos dias 3 e 6 de cultura, foram realizadas as análise de viabilidade com Azul de Trypan. O co-cultivo no método rotatório apresentou uma significativa redução da proliferação celular na superfície da matriz óssea em cultura prolongada (Fig. 6).

As células que não aderiram ao enxerto no co-cultivo em estufa rotatória foram colocadas em placa de 6 poços para análise morfológica em microscopia óptica. As células apresentaram tendência à formação de estruturas 3-D. Esse comportamento de aglomeração celular em cultivo

dinâmico já foi descrito na literatura por alguns autores (26-28) (Fig. 7). Não foram encontradas estruturas celulares 3-D no cultivo convencional.

Discussão

O objetivo do estudo *in vitro* do osso liofilizado bovino como biomaterial para engenharia tecidual óssea leva em consideração as suas qualidades favoráveis para uso clínico, disponibilidade de material, características de biocompatibilidade e biofuncionalidade em longo prazo (7,8). Contudo, há poucos estudos que utilizam esse enxerto como estrutura tridimensional na engenharia tecidual óssea. Alguns autores consideram que o osso liofilizado apresenta baixa (ou nenhuma) propriedade osteoindutiva (10,11). Dessa forma, torna-se importante o estudo da associação de MSCs com osso liofilizado, já que essas células possuem a capacidade de atribuir propriedades osteogênicas e osteoindutoras ao biomaterial.

A adesão de MSCs ao enxerto ósseo é um processo importante para o sucesso de tratamentos de reparação do tecido ósseo. Muito pouco foi publicado sobre a interação entre as células com potenciais osteogênicos e *scaffolds* ósseos. Orsi e colaboradores (22) avaliaram o potencial osteogênico de MSCs agregadas à estrutura tridimensional de osso liofilizado bovino através do método de co-cultivo convencional, no qual se permite a sedimentação de células sobre os construtos. Entretanto, os resultados mostraram que, com o método utilizado, a adição de células da medula óssea com potencial osteogênico sobre a estrutura de osso liofilizado bovino não agregou propriedades osteogênicas ao material. Outros autores sugerem

métodos mais sofisticados para favorecer a infiltração do meio de cultura entre os poros dos *scaffolds*, através de biorreatores, demonstrando que a estimulação mecânica de MSCs sobre *scaffolds* tridimensionais osteocondutivos pode aumentar a proliferação e a diferenciação celular, além da produção de matriz mineralizada (1). Sendo assim, faz-se necessária a elaboração de métodos alternativos de cultivo que possibilitem a adesão e a proliferação celular nos biomateriais de enxertia óssea.

No presente estudo, propomos um método alternativo de cultivo tridimensional entre MSCs e FOLs. O objetivo do cultivo dinâmico foi fazer com que as células pudessem, mecanicamente, aderir e proliferar na superfície óssea. Na organização tecidual, as células estão conectadas entre si e com a matriz extracelular. Esta possui diversas proteínas que fornecem propriedades mecânicas aos tecidos, e ajuda a organizar a comunicação entre as células incorporadas na matriz. Em cultura de células bidimensional, as propriedades biológicas e a interação celular mecânica e bioquímica são perdidas, pois essas células se encontram em um ambiente que não possibilita sua geometria natural. Entretanto, as culturas tridimensionais celulares podem simular um microambiente mais próximo da organização celular nos tecidos (26).

Os resultados do nosso trabalho demonstraram haver maior interação entre as células e o biomaterial ósseo, quando o co-cultivo foi realizado em estufa rotatória. Na histologia, foram observados aglomerados celulares na matriz óssea com a formação de múltiplas camadas de células. Embora a estufa rotatória não possua controle de umidade e fornecimento de CO₂, componentes necessários na manutenção de culturas de MSCs, tem-se maior proliferação e

viabilidade celular nos *scaffold* ósseos, quando comparada ao método convencional realizado em estufa de CO₂ com 100% de umidade. A utilização do Matrigel não possibilitou superior adesão celular aos FOLs, ainda que essa matriz seja indicada para culturas tridimensionais e para a aderência e diferenciação celular. O Matrigel não só é um produto comercialmente caro, como também apresenta componentes originados de sarcomas de ratos. Portanto, esse resultado vai ao encontro das necessidades clínicas em cirurgias ortopédicas, já que, dependendo do tamanho do enxerto, necessitaria de uma quantidade significativa de Matrigel na superfície do tecido ósseo a ser transplantado; e a utilização de uma matriz de origem animal em humanos poderia contribuir para uma maior possibilidade de rejeição de transplantes.

Em relação ao período que as células se manteriam na superfície do enxerto, realizamos o teste de viabilidade celular com azul de Trypan. Após o co-cultivo rotatório, grande número de células foi detectado na superfície do fragmento ósseo. Entretanto, nos dias 3 e 6 após o experimento em estufa rotatória, houve redução do número de células viáveis interagindo com o FOL em cultivo não dinâmico. O número reduzido de células viáveis na matriz óssea pode ser devido às mudanças do cultivo tridimensional para o cultivo bidimensional, em que há a alteração das propriedades biológicas e bioquímicas das células. Dessa maneira, a interação entre MSCs e FOLs é satisfatória após as 24h de cultivo em agitação, não sendo necessário um maior tempo de cultivo para aplicação do enxerto. Esse resultado vai ao encontro das necessidades clínicas que anseiam pelo enxerto o mais rápido possível, e evita o cultivo prolongado que pode acarretar alterações gênicas das MSCs (29).

Após o co-cultivo dinâmico, algumas células não aderiram ao enxerto e foram colocadas em placas de cultura para avaliação morfológica. Foi observada a formação de aglomerados celulares esféricos, resultantes do cultivo em agitação, em que as células tendem a se agrupar. A mudança da forma das MSCs é provavelmente resultado das condições de cultura em superfície não aderente, do alto grau de confluência e da privação de nutrientes (26). Entretanto, estudos mais detalhados sobre esses fatores devem ser conduzidos para melhor compreensão da formação desses agregados esferóides.

Em relação ao método convencional, foi verificada baixa quantidade e viabilidade de células aderidas ao enxerto. Além disso, por ser um cultivo bidimensional, as células não se fixaram nas diferentes superfícies ósseas. Foram verificadas células apenas na camada superior, onde a suspensão celular foi colocada. Também não foi verificada tendência à formação de esferóides celulares no cultivo convencional.

Dessa forma, foi desenvolvido um método de cultivo alternativo de MSCs em estufa rotatória com biomaterial, demonstrando que esse cultivo proporciona superior capacidade das células de se fixarem ao enxerto e possibilita o uso de terapia celular associada com enxertos ósseos em cirurgias de reparação óssea em modelo animal.

Agradecimentos

Este trabalho tem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Fundo de Apoio a Pesquisa (FIPE-HCPA). O trabalho foi conduzido por aluna da graduação, bolsista PIBIC/UFRGS.

Declaração de Divulgação

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Kasper FK, Liao J, Kretlow JD, Sikavitsas VI and Mikos AG. (2008). Flow Perfusion Culture of Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. StemBook: Tissue Engineering, S. Bhatia and J. Polak, Eds., Harvard Stem Cell Institute, Cambridge.
2. Oakes DA, Lee CC, Lieberman JR. (2003). An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (413): 281–290.
3. Partridge KA, Oreffo ROC. (2004). Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospect using viral and nonviral strategies. *Tissue Engineering* 10 (1/2): 295-307.
4. Cuomo AV, Virk M, Petrigliasso F, Morgan EF, Lieberman JR. (2009). Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *The Journal of Bone and Joint Surgery Am* 91: 1073-1083.
5. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with dog mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 10: 955–964.
6. Colterjohn NR, Bednar DA. (1997). Procurement of bone graft from the iliac crest. An operative approach with decreased morbidity. *J Bone Joint Surg Am* 79: 756-9
7. Macedo CAS, Galia CR, Silva ALB, Cesar PC, Sanches PRS, Duarte LS. (1999). Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. *Revista Brasileira de Ortopedia* 34 (9): 529-34.

8. Galia CR, Macedo CAS, Rosito R, Moreira, LF. (2009). Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. *Acta Ortopédica Brasileira* 17 (2): 24-28.
9. Oliveira ACP, Collares MVM, Galia CR, Edelweiss MI, Pinto RA, Kneibel L. (2007). Comparação entre enxerto ósseo autólogo, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo experimental de cranioplastia. *Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac* 10(4): 140-6.
10. Bostrom MPG, Seigerman DA. (2005). The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSSJ* 1: 9-18.
11. Baptista PPR, Polesello G, Guimarães RP, Fernandes ML. (1997). Emprego do enxerto ósseo liofilizado em lesões ósseas. *Revista Brasileira de Ortopedia* 32(11): 845-848.
12. Bielby R, Jones E, McGonagle D. (2007). The role of mesenquimal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury, Int. J. Care Injure* 38S1, S26-S32.
13. Caplan, AI. (2005). Mesenchymal stem cell: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Engineering* 11 (7/8): 1198-1210.
14. Nardi NB, Meirelles LS. (2006). Mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology* 174:249–282.
15. Cirne-Lima, EO. (2007). Stem Cells. *Revista do HCPA & Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul* 27: 66-73.
16. Cuomo AV, Virk M, Petriogliasso F, Morgan EF, Lieberman JR. (2009). Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. *The Journal of Bone and Joint Surgery Am.* 91: 1073-1083.

17. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. (2008). Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified Tissue International* 82:238-247.
18. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 126:37-42.
19. Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. (2008). Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47:22-30.
20. Choi JJ, Yoo SA, Park SJ, Kang YJ, Kim WU, Oh IH, et al. (2008). Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 153:269-276.
21. C Jorgensen C, Djouad F, Apparailly F, Noe"l D. (2003). Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Therapy* 10: 928–931.
22. Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, Pinto R A, Meirelles LS, Meurer L, Pilla C, Portinho CP, Riboldi M, Auler TB. (2007). Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial* 10(4): 133-9.
23. Portinho CP, Collares MVM, Meirelles L, Silva FH, Pinto RDA, Nardi N, Pilla C, Meurer L, Edelweiss MIA, Riboldi M, Siqueira E, Morellato G, Renosto R, Sumino K. (2006).

- Reconstrução óssea experimental de calota craniana com enxerto de células-tronco mesenquimais. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.* 21(3): 161-5.
24. Paz AH, Salton GD, Ayala-Lugo A, Gomes C, Terraciano P, Scalco R, Laurino CC, Passos EP, Schneider MR, Meurer L, Cirne-Lima E. (2011). Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells and Development* 20 (2): e-pub ahead of print
25. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Corthenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS and A Keating. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.
26. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. (2005). Gene expression perturbation in vitro—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology* 15: 405–412.
27. Barros APDN, Takiya CM, Garzoni² LR, Ferreira MLL, Dutra HS, Chiarini LB, Meirelles MN, Borojevic R, Rossi MID. (2010). Osteoblasts and Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Control Hematopoietic Stem Cell Migration and Proliferation in 3D In Vitro Model. *PLoS ONE* 5(2): e9093.
28. Bartosh TJ, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *PNAS* 107 (31): 13724-13729.

29. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. (2005). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24(4):1095-103.

Figuras

Figura 1: Osso liofilizado bovino fragmentado.

Figura 2: Métodos de co-cultivo de MSCs e FOLs. (A) Método rotatório. A cada tubo de cultura, com superfície não aderente e fundo redondo, foi adicionado um FOL e uma suspensão de 10^6 células em 1,5 mL de meio de cultivo. As culturas foram mantidas a 37°C em 160rpm por 24h. (B) Método convencional. A cada poço da placa de cultura com superfície aderente, foram colocados 1,5ml de meio de cultivo contendo 10^6 células sobre cada FOL. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

Figura 3: Potencial de diferenciação das MSCs. (A) Morfologia das MSCs coradas com H&E. (B) Diferenciação adipogênica: vacúolos lipídicos corados com Oil Red. (C) Diferenciação osteogênica: depósitos de cálcio corados com Vermelho de Alizarina.

Figura 4: Quantidade de células aderidas (pixels) na superfície óssea após 24h de co-cultivo pelo método rotatório e pelo método convencional. O co-cultivo em estufa rotatória possibilitou maior quantidade de células aderidas na matriz do osso liofilizado quando comparado ao co-cultivo convencional. Os valores representam a média da triplicata de dois independentes experimentos (*p<0.05 e **p<0.01 comparado com o grupo CO(R)). CO (célula e osso), MOC (osso, matrigel e células), CV (método convencional), R (método rotatório).

Figura 5: Histologia (H&E) demonstrando a associação de MSCs e FOLs. (A) MSCs aderidas na superfície óssea pelo método rotatório. Pode se observar a formação de múltiplas camadas celulares. (B) MSCs aderidas na superfície óssea pelo método convencional, sem a formação de camadas múltiplas. Aumento de 100x.

Figura 6: Avaliação da viabilidade celular por azul de trypan no co-cultivo rotatório e no convencional. As análises ocorreram nos dias 0, 3 e 6, após os co-cultivos. Os resultados demonstraram maior quantidade de células na superfície do osso liofilizado no dia 0 pelo método de cultivo em agitação. Os valores representam a média da triplicata de dois independentes experimentos (* $p < 0.05$ comparado com método rotatório no dia 0).

Figura 7: Formação de aglomerados celulares após o cultivo celular pelo método em agitação. Aumento de 100x.

Tabelas

Tabela 1: Verificação do pH do meio de cultura na presença de FOLs. Não houve variação significativa do pH do meio de cultura na presença dos *scaffolds* ósseos ao longo do tempo quando comparado ao pH do meio puro ($p=0.1423$).

Tabela 2: Média e Desvio Padrão dos grupos CO (células e osso) e MOC (matrigel, osso e célula) quando submetidos ao método de cultivo rotatório (R) e convencional (CV). Os valores são expressos em pixels.

Figura 1



Figura 2

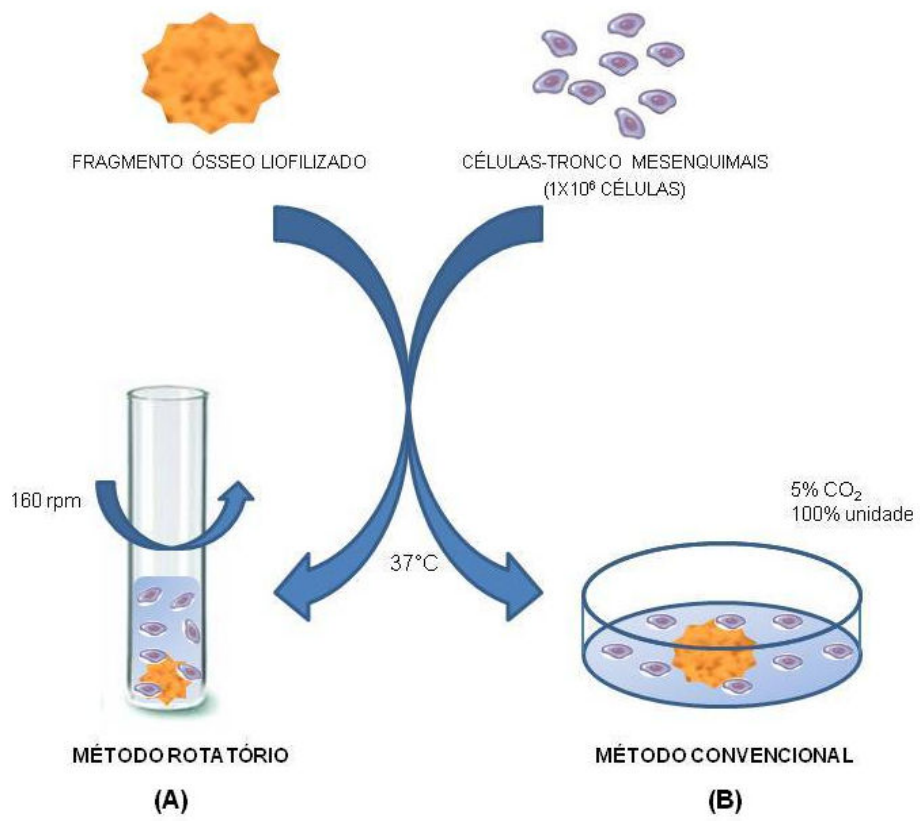


Figura 3

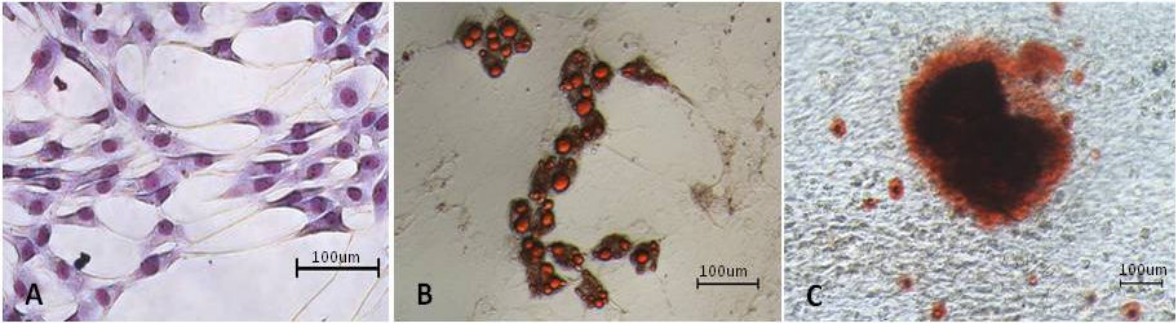


Figura 4

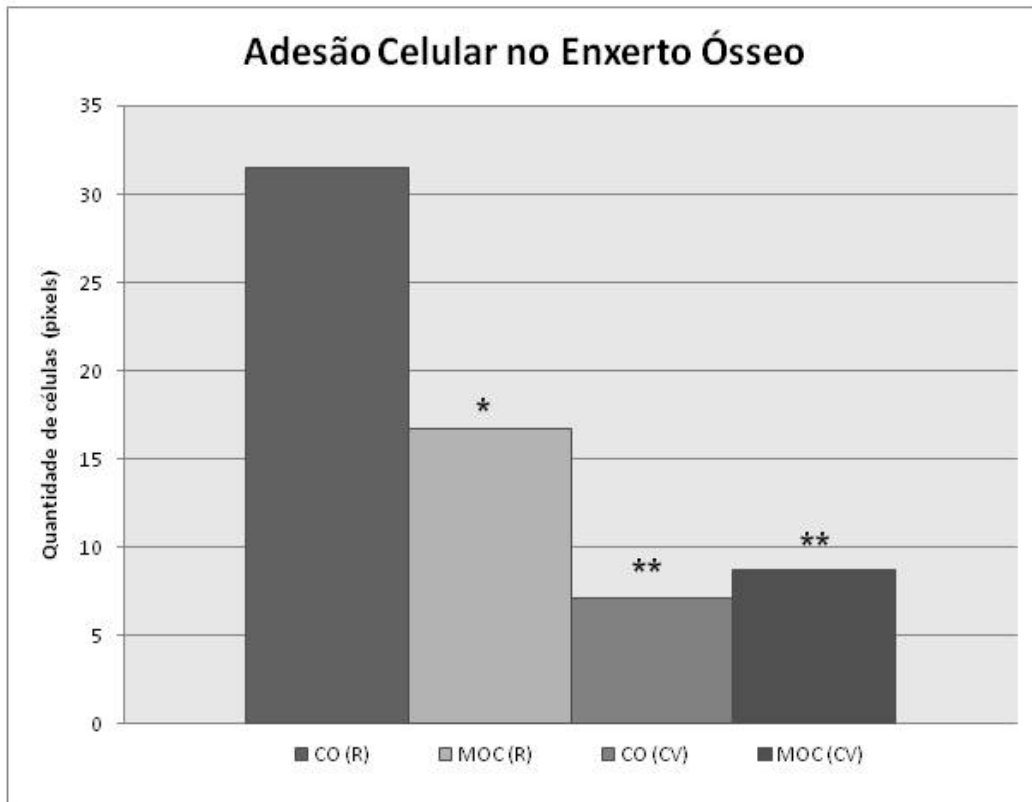


Figura 5

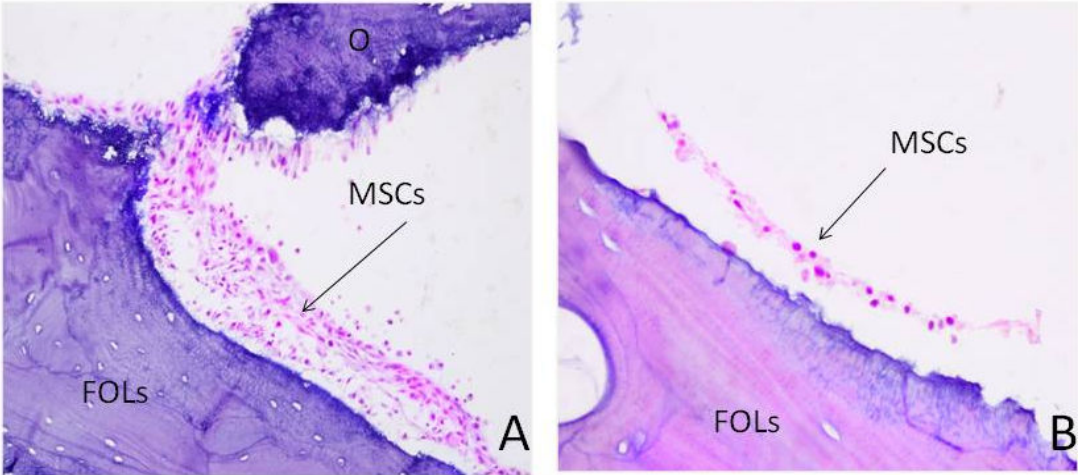


Figura 6

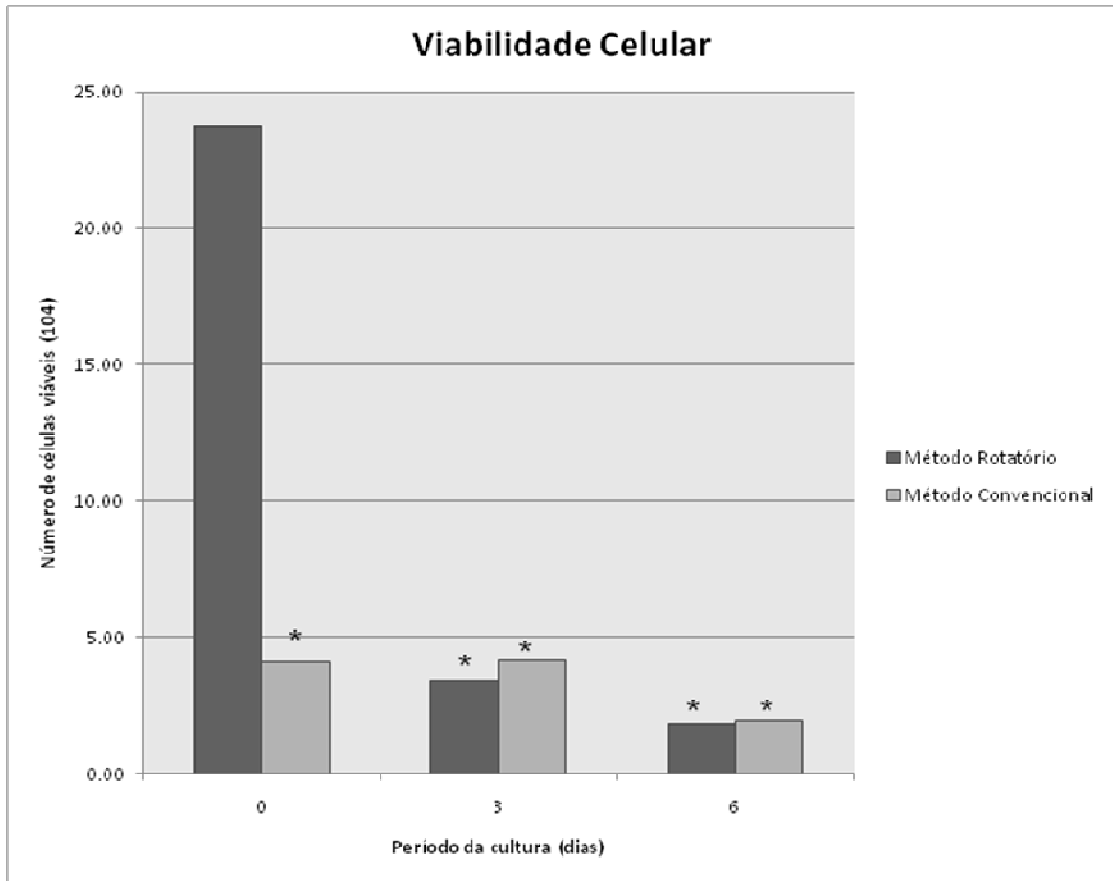


Figura 7

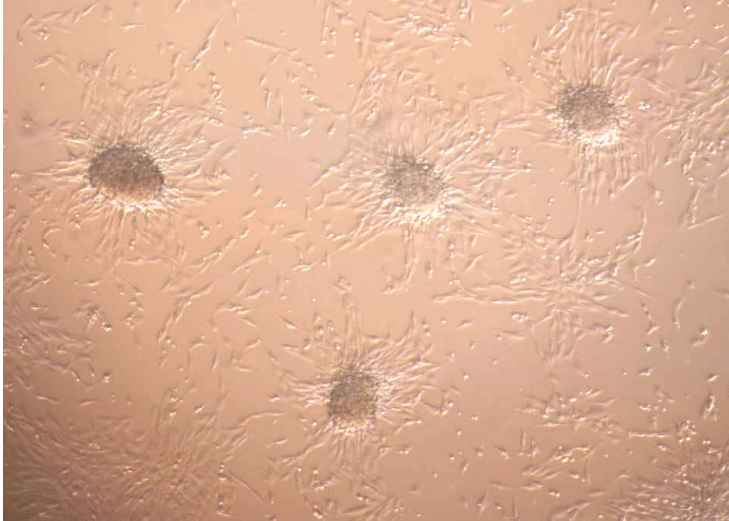


Tabela 1

	D0	D1	D2	D3
Meio Puro	7.33	7.52	7.48	7.47
Meio e FOLs	7.33	7.42	7.41	7.42

Tabela 2

	CO (R)	MOC (R)	CO (CV)	MOC (CV)
Média	31.5	16.5	3.75	8.75
Desvio Padrão	8.34	11.15	3.59	4.99

