

ANTONIO CARLOS ALOISE

**TGF- β 1 EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS
HUMANOS CULTIVADOS EM ESPONJA DE
COLÁGENO**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2009

ANTONIO CARLOS ALOISE

**TGF- β 1 EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS
HUMANOS CULTIVADOS EM ESPONJA DE
COLÁGENO**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO

CO-ORIENTADORES: Prof. MAX DOMINGUES PEREIRA

Prof. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

SÃO PAULO

2009

Aloise, Antonio Carlos

TGF-beta1 em fibroblastos dérmicos humanos cultivados em esponja de colágeno

Antonio Carlos Aloise -- São Paulo, 2009.

xvii, 95f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: TGF- beta 1 in human dermal fibroblasts cultured in a collagen sponge.

1. Fibroblastos 2.Diferenciação celular. 3.TGF- β 1 . 4. Colágeno

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

**VICE-COORDENADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO
FERREIRA**

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram da elaboração deste estudo, mesmo quando ainda se tratava de uma idéia sem pretensão de ser realizada.

À minha esposa Adriana, companheira e figura central na minha vida, incentivou e permitiu que eu pudesse ter a paz necessária para elaboração desta tese, tomando para si todas as outras tarefas, que eu havia prometido nunca deixar de fazer. “espero poder fazer o mesmo por ti, enquanto isto aceita meu agradecimento e imenso amor”

Ao meu filho Stefano, com a pretensão da esperança de que um dia, ele leia este manuscrito e sinta tanto orgulho do pai, quanto eu sinto dele.

Aos meus Pais Francesco e Maria, aos meus Avós Carmine e Paolina, aos meus Irmãos Carmine e Paula, aos meus Cunhados Alexandre, Roberto e Luciano, minhas Cunhadas Andrea e Patrícia e aos meus Sogros Angel e Maria Luiza, eu realmente adoro todos vocês, muito obrigado pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA** CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO- UNIFESP, pelo modelo de professora e pesquisadora exemplar, pela gestão do programa de pós-graduação que permitiu a integração no seu mais amplo espectro, pelo exemplo de líder formador, que tem por objetivo formar outros líderes, para isto é necessário coragem e conhecimentos na mesma proporção.

Ao **Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO** PROFESSOR ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP e ORIENTADOR DESTA TESE , professor capaz e íntegro dotado de uma inteligência ímpar, tenacidade admirável, espero ser merecedor da sua amizade.

Ao **Prof. MAX DOMINGUES PEREIRA** PROFESSOR ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP E CO-ORIENTADOR DESTA TESE, professor abnegado e disciplinado, obrigado pelos ensinamentos

Ao **Prof. SILVIO EDUARDO DUAILIBI** PROFESSOR ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP CO-ORIENTADOR DESTA TESE, professor de um humor e inteligência enormes, bondoso oferece apoio sempre mas sabe pedir atenção e disciplina

Á MIGUEL SABINO NETO, IVAN DUNSHEE A. O. SANTOS, BERNARDO SÉRGIO HOCHMAN, CARLOS EDUARDO PINFILDI, DULCE MARIA FONSECA SOARES MARTINS, ELVIO BUENO GÁRCIA, FÁBIO XERFAN NAHAS, GAL MOREIRA DINI, HEITOR FRANCISCO DE CARVALHO GOMES, , JOSÉ LUIZ G. BRETOS, LEILA BLANES, LUIZ EDUARDO FELIPE ABLA, MARCOS VINICUS J. BARBOSA, MONICA TALARICO DUAILIBI, PAULO FARBER, REGINA H. OKAMOTO, RICHARD ELOIN LIEBANO, ROBERTO RUDGE RAMOS_PROFESSORES ORIENTADORES, CO-ORIENTADORES E COLABORADORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP.

Á MARIA LUIZA CHRISTOVÃO RAMOS, ALESSANDRA HADDAD, VANINA MONIQUE T. VIEGAS, RICARDO LUIZ PISICIOLARO, SILVANA GAIBA, MARIA JOSÉ DE A. BRITO, FABIANNE M. P. FURTADO, MATHIAS WOLFGANG MATHONY WEINSTOCK, GERALDO MAGELA SALOME, IVAN RENÉ V. OMONTE, PAULO SÉRGIO ZAIDAN MALUF, LUIZ ANTONIO ROSSETO, RODOLPHO A. BUSSOLARO, FLÁVIO KFOURI, CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO, VIVIANE TIMM WOOD, MARCO AURÉLIO INVALIDI NEVES, GABRIELA SOARES SILVA BRITO, MARCELLO DI MARTINO, PASCALE MUTTI TACANTI, RAFAEL CORRÊA GOBBATO, JULIANA PEREZ R. HUIJSMANS, ÂNGELA CRISTINE B. FERREIRA, LANA LOURENÇO, SORAIA FRANCISCO FERRARA, NAIF TADEU NAIF DE ANDRADE, JORGE MANUEL,

MICHELE AKEMI NISHIOKA, MILENE RUSSO BRANKOVIC, RONALDO VIDAL E ANTONIO PARENTI FILHO. ALUNOS DE MESTRADO E DOUTORADO, QUERIDOS AMIGOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP.

À **MARTA REJANE R. SILVA, SANDRA DA SILVA e SILVANA AP. COSTA DE ASSIS** SECRETÁRIAS DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA amizade, profissionalismo e muito carinho para com todos. Eu não poderia estar em melhores mãos.

Á Profa. Dra. **EDNA HAAPALAINEN** DIRETORA DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CEME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á Profa. Dra. **RITA DE CÁSSIA SINIGAGLIA GALLI COIMBRA** PROFESSORA VISITANTE DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E ORIENTADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á **MÁRCIA TANAKAI** TÉCNICA NÍVEL SUPERIOR DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CEME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á **ANDRÉ AGUILLERA** TÉCNICO DE NÍVEL MÉDIO DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CEME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á **PATRÍCIA MILANEZ** FOTÓGRAFA DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CEME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á MARIA ISABEL DOS SANTOS SECRETÁRIA DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA (CEME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, UNIFESP.

Á JOAQUIM SOARES DE ALMEIRA TÉCNICO DE LABORATÓRIO DA DISCIPLINA DE PATOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO, UNIFESP.

EPÍGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht (1954)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
1.INTRODUÇÃO.....	2
2.OBJETIVO.....	6
3.LITERATURA.....	8
4.MÉTODOS.....	27
5.RESULTADOS.....	39
6.DISSCUSSÃO.....	59
7.CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	81
ABSTRACT.....	90
APÊNDICE.....	91
ANEXO.....	94
FONTES CONSULTADAS.....	95

Lista de Figuras

- Figura 1. Esponja de Colágeno: a- aspecto lateral, b- aspecto superior, c- placa de 24 poços com as esponjas de colágeno inseridas.....30
- Figura 2. Esquema de distribuição dos grupos na placa de 24 poços.....31
- Figura 3. Avaliações: a- KIT para o teste de ELISA OSTEOCALCIN(ZYMED LAB, Inc CA USA), b- Placa de 96 poços utilizada no teste ELISA para osteocalcina mostrando a mudança de cor nos poços no momento da colocação da solução de interrupção, c-Espectrofotômetro Multiskan, CA USA.....34
- Figura 4. Valores das médias da triplicata da quantificação da atividade da FAL expressor em IU/L medidos no Espectrofotômetro a um nível de 405nm.....40
- Figura 5. Valores das médias da triplicata da quantidade de OC expressa em ng/ml, medidos pelo teste ELISA no espectrofotômetro a um nível de 450nm.....43
- Figura 6. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por dois dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....46
- Figura 7. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por sete dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....47

Figura 8. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 14 dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	48
Figura 9. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 21 dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	49
Figura 10. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 28 dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	50
Figura 11. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 56 dias e corada com Azul de toluidina e Fuccina a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	51
Figura 12. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por dois dias e corada pela técnica de Von Kossa a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	52
Figura 13. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por sete dias e corada pela técnica de Von Kossa a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	53
Figura 14. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 14dias e corada pela técnica de Von Kossa a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	54

Figura 15. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 21 dias e corada pela técnica de Von Kossa	
a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog.	
d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	55
Figura 16. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 28 dias e corada pela técnica de Von Kossa	
a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog.	
d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	56
Figura 17. Aspecto microscópico da esponja de colágeno cultivada por 56 dias e corada pela técnica de Von Kossa	
a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog.	
d) grupo Osteog.TGF- β 1.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores das médias da triplicata da quantificação da atividade da FAL expressos em IU/L, medidos por teste no espectrofotômetro a um nível de 405 nm.....	39
Tabela 2. Comparação estatística entre os valores da média da triplicata da atividade da fosfatase alcalina(FAL) expressa em IU/L.....	41
Tabela 3. Valores da média da triplicata da quantidade de osteocalcina expresso em ng/ml obtidos pelo teste ELISA a um nível de 450 nm.....	42
Tabela 4. Comparação estatística entre os valores das médias da Triplicata da quantidade de osteocalcina expresso em ng/ml.....	44
Tabela 5. Resultados da coloração de Von Kossa em relação à presença de depósitos mineralizados de cálcio fosfato na esponja de colágeno.....	45

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- AA	ácido ascórbico
- β -GF	beta glicerofosfato
- BMP	proteínas modificadas do osso
- CO ₂	dióxido de carbono
- COL	colágeno
- DEX	dexametasona
- DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DO	densidade óptica
- ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
- ET	Engenharia Tecidual
- FAL	fosfatase alcalina
- FGF	fator de crescimento de fibroblastos
- FDH	fibroblastos dérmicos humanos
- IU	unidade internacional (<i>international unit</i>)
- L	litro
- M	molar
- MEC	matriz extra-celular
- mM	milimolar
- mL	mililitro
- mg	miligrama
- ng	nanograma
- nM	nanomolar
- nm	nanômetro
- pH	potencial hidrogeniônico
- OC	osteocalcina

- OP	osteopontina
- O ₂	oxigênio
- ON	osteonectina
-SFB	soro fetal bovino
- t	tempo
-TGF-β1	fator de crescimento transformante beta 1
- U	unidade
-Vol	volume
-VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
- W	watts
- μm	micrograma
- μL	microlitro
- °C	grau Celsius
-%	percentagem

RESUMO

Introdução: A busca por uma fonte alternativa de células para a Engenharia Tecidual óssea, se deve a morbidade da área doadora e maior dificuldade de expansão *in vitro* quando da utilização de células de linhagem osteoblástica, como as células da medula óssea. Portanto, a busca de outras fontes celulares para contribuir para esta terapia, se torna fundamental. **Objetivo:** Avaliar a influência do fator de crescimento transformante beta1(TGF- β 1) na diferenciação celular de fibroblastos dérmicos humanos cultivados em esponja de colágeno. **Métodos:** As esponjas de colágeno foram cortadas em peças de 16mm de diâmetro e 2 mm de espessura sendo distribuídas em quatro grupos denominados de acordo com o meio de cultura: CONTROLE (Padrão); TGF- β 1 (Padrão acrescido de 10ng/mL de TGF- β 1); OSTEOP. Padrão acrescido de 0,5 μ g/mL de ácido ascórbico, 10 mMol/L de β -glicerofosfato e 10nMol/L de dexametasona) e OSTEOP.TGF- β 1(meio osteogênico acrescido de 10ng/mL de TGF- β 1). As avaliações da atividade da fosfatase alcalina (FAL) e quantidade de osteocalcina (OC) foram realizadas no sobrenadante. A interação das células com a esponja de colágeno foi avaliada pela exame histológico e a presença de depósitos de cálcio fosfato realizada pelo teste de Von Kossa, todas as avaliações foram realizadas no segundo, sétimo, 14°, 21°, 28° e 56° dias. **Resultados:** Atividade da FAL e Quantidade de OC: não houve diferença entre os grupos CONTROLE e TGF- β 1 em nenhuma das avaliações e em nenhum dos pontos de avaliação, no entanto na comparação com os outros dois grupos, os valores foram significativamente menores, o grupo OSTEOP.TGF- β 1 obteve valores significativamente. Interação Célula/Esponja: em todos os grupos as células inicialmente estavam na superfície com posterior penetração para o interior da esponja. Depósitos Mineralizados: não existiu a presença nos grupos CONTROLE e TGF- β 1 e nos grupos OSTEOP. e OSTEOP. TGF- β 1 existiu a presença de depósitos a partir do 14° dia até o 56° dia. **Conclusão:** O TGF- β 1 no meio osteogênico, na cultura de fibroblastos dérmicos humanos em esponja de colágeno, aumentou a atividade da FAL e a quantidade de OC, não alterando a interação célula/esponja e a presença de depósitos mineralizados de cálcio fosfato na estrutura da esponja de colágeno

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O tratamento para as perdas críticas de tecido ósseo, ou seja, perdas que levam a um comprometimento da forma ou função do osso afetado, vem sendo realizado com a utilização de enxertos autógenos, alógenos ou xenógenos, com a utilização de metais inertes e mais recentemente com a Engenharia Tecidual (ET). A Engenharia Tecidual pode ser definida como sendo uma estratégia tecnológica para a regeneração tecidual, utilizando uma abordagem multidisciplinar que aplica os princípios da biologia e engenharia para o desenvolvimento de substitutos viáveis que restaurem, mantenham ou melhorem a função de tecidos humanos (VACANTI *et al.*, 1993; LANGER & VACANTI, 1993).

Atualmente, são descritas três estratégias para a Engenharia Tecidual: 1) tecidos humanos são desenvolvidos *in vitro* para posterior implantação, tem como exemplo o enxerto de pele (ELDAD *et al.*, 1987) 2) a implantação de dispositivos contendo ou não células que induzem a regeneração dos tecidos (CARVER & HEATH, 1999) e 3) o desenvolvimento de dispositivos externos contendo células, que tem a finalidade de substituir os tecidos danificados, este princípio requer o estabelecimento de uma linhagem primária de células, que é posteriormente semeada sobre ou dentro de matrizes estruturais (arcabouços), sendo este conjunto implantado no corpo humano (SHINOKA *et al.*, 1995), exemplos desta estratégia incluem a regeneração do osso, cartilagem, tendão e endotélio.

Na Engenharia Tecidual Óssea, a fonte celular de eleição é a de linhagem osteoblástica como as células da medula óssea, mas segundo HEE *et al.* (2006) é necessário um número elevado de células para esta estratégia o que implicaria em uma maior morbidade da área doadora e maior tecnologia para a amplificação *in vitro*. No entanto, outros tipos

celulares foram pesquisados quanto a sua capacidade de diferenciação osteogênica ou na expressão de marcadores osteogênicos, tais como os adipócitos, fibroblastos, queratinócitos e condrócitos (HEE *et al.*, 2006).

Fibroblasto é um tipo de célula predominante no tecido conjuntivo responsável pela maior parte da produção de matriz extra-celular (MEC) e fatores de crescimento neste tecido. Estudos *in vitro* têm mostrado que fibroblastos sub-epiteliais podem estimular a proliferação de queratinócitos via fatores de difusão e que queratinócitos podem induzir a expressão genética de fibroblastos, o que coloca esta célula em evidência nos estudos de diferenciação (WANG *et al.*, 2004).

Dentre os fatores de crescimento e citocinas que influenciam o crescimento ósseo, podemos destacar o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1), a proteína óssea morfogenética (BMP), o plasma enriquecido por plaquetas (PRP-A), o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A presença do fator de crescimento transformante-beta1 aumenta a síntese de matriz proteoglicana e a síntese de colágeno (THOLPADY *et al.*, 2007).

O TGF- β 1 é o fator de crescimento que está implicado no controle da proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de muitos tipos celulares, dentre eles o osteoblasto e o fibroblasto. Sua influência abrange os processos de embriogênese, angiogênese, inflamação e reparação tecidual (THOLPADY *et al.*, 2007). No tecido esquelético, o TGF- β 1 exerce um papel importante na manutenção do desenvolvimento, afetando tanto o próprio osso quanto a cartilagem no seu metabolismo (FARHADI *et al.*, 2004).

Os biomateriais para Engenharia Tecidual são divididos quanto a sua natureza em duas grandes classes, os naturais e os sintéticos (CHEN *et al.* ,

2000; GOLDSTEIN *et al.*,2001; CHEN *et al.*, 2004). Os biomateriais devem exibir características como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formatação, nenhuma reação imunogênica, força estrutural adequada, capacidade de agregar fatores de crescimento. A esponja de colágeno é um biomaterial do tipo natural, com força estrutural capaz de permitir a proliferação celular e não interfere no micro-ambiente, celular, já que não causa reação de corpo estranho e não possui fatores imunogênicos (JAWORSKI & KLAPPERICH, 2006).

Fibroblastos proliferativos apresentam parte da sua população, que pode ser considerada, uma população de célula tronco adulta com capacidade de diferenciação, estas células poderiam, por estímulo adequado, dentre eles a estimulação por suplementação de TGF- β 1 adicionalmente no meio de cultura osteogênico, induzir a produção de proteínas específicas do tecido ósseo. Este mecanismo de Engenharia Tecidual pode num futuro próximo se constituir em um dos procedimentos para regeneração óssea, principalmente nos casos dos defeitos críticos congênitos ou adquiridos.

Não foi encontrado na literatura consultada, nenhum estudo que avaliasse a ação do fator de crescimento transformante beta-1 na diferenciação osteogênica de fibroblastos dérmicos humanos.

Portanto, tendo em vista que o TGF- β 1 não foi associado ao meio de cultura osteogênico até o momento, essa associação pode apresentar alguma ação sobre a diferenciação de fibroblastos dérmicos no sentido de expressar atividade osteoblástica.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a ação do fator de crescimento transformante β -1 na diferenciação de fibroblastos dérmicos humanos cultivados em esponja de colágeno.

LITERATURA

2. Literatura

GREEN & GOLDBERG (1963) avaliaram a cinética e a síntese de colágeno em fibroblastos de ratos. Um número fixo de células foi semeado em placas de cultura, notando-se uma proliferação celular exponencial por 3 dias. À partir de então, houve um declínio rápido da proliferação dessas células que atingiram a confluência na superfície da placa. Não houve mais aumento no número de células por 24 dias, sendo que estas se mantiveram viáveis. A síntese do colágeno no conteúdo da placa foi avaliada neste mesmo período por meio da dosagem da hidroxiprolina. Durante a fase de proliferação exponencial, foram encontrados valores baixos e constantes de colágeno (0 a 4 dias); no quinto dia, quando o número de células se aproximou do máximo, houve aumento linear na dosagem da hidroxiprolina. Concluíram então que, o colágeno não começa a se acumular na placa de cultura até se completar o período rápido de crescimento.

GREEN & GOLDBERG (1964) relataram um dos primeiros estudos em cultura de fibroblastos de rato, mostrando a produção de colágeno pelas células. Para a avaliação da produção de colágeno, foi incorporado ao meio um isótopo da prolina. O estudo mostrou que quando as placas estavam perto da confluência, de 3 a 3,5 % da proteína produzida era colágeno. Após a replicação, a síntese de colágeno começou a cair, quando a multiplicação celular era considerável. Neste nível, cerca de 0,25 % da proteína produzida era colágeno. Próximo da confluência, a taxa de produção de colágeno começou a subir rapidamente e logo atingiu os valores típicos de síntese em placas confluentes. Para determinar se estas

mudanças no meio de cultura de placas confluentes influenciavam a produção de colágeno, foi avaliado o efeito da adição de ácido láctico no meio de cultura. Esta adição foi inibitória para a síntese protéica, começando com pequenas concentrações, ficando muito maior, em altas concentrações. Na presença de baixas concentrações de ácido láctico houve aumento na incorporação da prolina, e nas altas concentrações, aumento em três vezes quando comparado com placas sem lactato. Concluíram que até as mais altas concentrações de lactato não afetaram o crescimento celular, mas estimularam a síntese de colágeno.

REDDI & HUGGINS (1972) relataram que a diferenciação de fibroblastos de animais adultos foi um remanescente do processo de diferenciação embrionário. Os autores utilizaram um pó de osso insolúvel, proveniente do osso parietal de ratos, o qual possui um quimiotaxia de atração para fibroblastos, em uma cultura de fibroblastos conjuntamente com um preparado de células da medula óssea e observaram que após 24 horas de cultura, havia a formação de um agregado celular, no centro da cultura o qual observou-se células com fenótipo de condroblastos e osteoblastos. Concluíram que a utilização de enxertos de osso parietais poderia ser uma alternativa para solução de defeitos ósseos.

VACANTI *et al.* (1993) relataram que existem muitos estudos sobre a diferenciação de tecidos mesenquimais em tecido ósseo, e que isto estava sendo alcançado por meio de polipeptídeos e osso em pó desmineralizado ou a união dos dois métodos. Em relação à cartilagem, suas células em suspensão aderiam naturalmente em matrizes. Os autores utilizaram

polímeros biodegradáveis sintéticos como modelos, onde se poderia semear células anteriormente á implantação. Todos os modelos foram implantados no mesmo lugar por seis semanas, e por meio deste estudo puderam concluir que os polímeros de ácido poliglicólico (PGA) poderiam ser utilizados como matriz para semeadura de células para criação de um novo osso ou cartilagem.

CLARK *et al.*, (1997) realizaram estudo onde mostraram que o TGF- β 1 em condições específicas de cultura, levavam fibroblastos dérmicos humanos a crescerem em camadas estratificadas mimetizando a fibroplasia que ocorre *in vivo*. Quando o meio de cultura suplementado com soro, ascorbato, prolina e TGF- β 1, foi adicionado às culturas três vezes por semana, os fibroblastos proliferaram, estratificando-se em até 16 camadas. O TGF- β 1 estimulou a síntese de DNA nessas culturas pós-confluentes. A estratificação foi dependente da incorporação de fibronectina, demonstrada com anticorpos anti-fibronectina, que inibiram a proliferação celular basal. Os autores concluíram que o TGF- β 1 estimulou a cultura de fibroblastos pós-confluentes e dependentes de fibronectina, a proliferar criando um tecido igual a fibroplasia *in vitro*.

LOCKLIN, OREFFO, TRIFFITT (1998) destacaram que adipócitos e osteoblastos tem origem comum de células tronco fibroblásticas, conseqüentemente a modulação do processo de adipogênese e osteogênese tem implicações para a possibilidade do tratamento de doenças metabólicas do osso, como a osteoporose. Para tal, os autores investigaram os efeitos do TGF- β , bFGF e dexametasona na cultura de células da medula óssea humana, também denominadas células tronco fibroblásticas e avaliaram o

seu efeito sobre a adipogênese e osteogênese. Na ausência de soro fetal bovino, o TGF- β causou um aumento dose-dependente no crescimento celular e na atividade da fosfatase alcalina, entretanto na presença de soro fetal bovino o crescimento foi inibido em altas concentrações e a fosfatase alcalina não foi afetada. O TGF- β aumentou a quantidade de matriz de proteoglicana e da síntese de colágeno, o b-FGF inibiu o aumento da fosfatase alcalina e aumentou o número de colônias, bem como o seu tamanho. A dexametasona induziu a formação de adipócitos, sendo que todos os resultados apresentaram seu pico máximo em sete dias.

ANDRADES *et al.* (1999) compararam os efeitos do TGF- β recombinante com os fatores de crescimento mais largamente utilizados como fatores osteogênicos, como a BMP-2,7 a OP-1 e b-FGF. Realizaram o cultivo de células da medula óssea de ratos Fisher em um gel de colágeno por 10 dias, onde então avaliaram a expressão da fosfatase alcalina a produção de osteocalcina. A conclusão foi de que o TGF- β 1 recombinante humano, promoveu sobrevivência, proliferação e diferenciação e formação de colônias das células precursoras ósseas. Os autores puderam observar que o TGF- β 1 recombinante comercial não apresentou comportamento diferente do natural, liberado pelas células.

COELHO & FERNANDES (1999a) avaliaram a biocompatibilidade de células ósseas cultivadas, onde na primeira parte avaliaram a diferença do uso do meio de cultura alfa-MEM e DMEM. Para este estudo utilizaram células de medula humana provenientes de cirurgias e foram cultivadas em alfa-MEM e DMEM, contendo soro fetal bovino e antibióticos e

suplementado com dexametasona. As avaliações realizadas foram ensaios bioquímicos, viabilidade e proliferação, proteína total, atividade da fosfatase alcalina e depósito de cálcio. Os autores puderam concluir que os parâmetros osteoblásticos diminuíram nas passagens de células, particularmente entre a primeira e segunda passagens, em condições laboratoriais a presença de ácido ascórbico, beta-glicerofosfato e dexametasona mostrou atividade osteoblástica e em relação aos tipos de meio, o alfa-MEM mostrou atividade osteoblástica na primeira e segunda passagem e o DMEM somente na primeira passagem.

COELHO & FERNANDES (1999b) na segunda parte deste estudo, os autores estudaram o efeito do ácido ascórbico, beta-glicerofosfato e dexametasona na diferenciação osteoblástica. Foram analisados o comportamento das células da medula óssea humana quanto a diferenciação e proliferação de células cultivadas em meio alfa-MEM suplementado com soro fetal bovino, antibióticos, ácido ascórbico, beta-glicerofosfato e dexametasona. Os grupos foram comparados em relação à morfologia, crescimento celular, atividade da fosfatase alcalina e habilidade de formar depósitos de cálcio. Os autores concluíram que a presença de dexametasona resultou numa significativa indução da atividade da FAL, e na habilidade de formar depósitos de cálcio. E confirmando os resultados de estudos anteriores a presença de ácido ascórbico e beta-glicerofosfato resultaram no aumento da atividade osteoblástica.

CHEN, USHIDA & TATEISH (2000) desenvolveram uma malha de polímero sintético e esponja de colágeno, que apresentaria as propriedades do polímero sintético como força mecânica e biodegradabilidade controlada e as propriedades do arcabouço natural como, por exemplo,

biocompatibilidade e nenhuma reação de corpo estranho. Neste estudo foram utilizados fibroblastos dérmicos cultivados em DMEM e as avaliações realizadas através de microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que a hibridização é um método eficiente de confecção de arcabouços para engenharia tecidual.

GOLDSTEIN *et al.* (2001) cultivaram células da medula óssea de ratos sobre arcabouços de ácido poli(DL-lático-co-glicólico) (PLGA) 75:25 em meio osteogênico suplementado com dexametasona e avaliaram o efeito sobre o crescimento celular e a função dos polímeros biodegradáveis após a semeadura das células. Os autores avaliaram a quantidade de células através da análise de DNA por fluorometria, mensuração da atividade da fosfatase alcalina em quatro diferentes esquemas de cultura para promover crescimento e função osteoblástica na semeadura de células sobre arcabouços de PLGA. Este estudo revelou a complexidade da cultura sobre arcabouços e que a atividade da fosfatase alcalina foi menor nos arcabouços que foram cultivados fora da perfusão.

LAWRENCE (2001) em uma revisão sobre o TGF- β latente relata que este foi descoberto em 1981, pela capacidade de induzir o crescimento de fibroblastos em ágar. Dois anos mais tarde, o TGF- β foi purificado de três fontes: plaquetas humanas, placenta humana e rim bovino. Em 1985, foram descobertas outras duas isoformas TGF- β 2 e β 3. Inúmeras doenças provém da insuficiência ou ausência destas citoquinas, a isoforma TGF- β 1, segundo o autor, é ativada em um pH 3,0, sendo que a acidificação transiente na cultura de fibroblastos resulta na ativação do TGF- β 1 *in situ*. Existiu evidência que as situações *in vivo*, seguem o mesmo esquema e acontecem em microambientes acidificados. Tem-se mostrado ultimamente

que a ativação de TGF- β latente pode ser realizada pela vitamina D3, dexametasona e a interleucina-1- β .

WALSH *et al.* (2001) estudaram os efeitos de uma glicoproteína sintética sobre o recrutamento, proliferação e maturação de células humanas de linhagem osteoblástica, avaliaram linhagem de células da medula óssea de 30 indivíduos, com histórico de doença óssea por 28 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de colônias formadas, contagem celular e determinação da atividade da fosfatase alcalina e expressão de TGF-beta1. A adição de dexametasona, influenciou o tamanho mas não o número de colônias, aumentou a expressão da fosfatase alcalina com adicional recrutamento e maturação de células humanas de linhagem osteoblástica.

KIM & NIYBIZI (2001) avaliaram o efeito de ambos, TGF- β 1 e rhBMP-2 na indução de células estromais da medula óssea em um arcabouço de gel de colágeno, sendo que realizaram o isolamento de células da medula óssea de osso pélvico, em cirurgias ortopédicas e as cultivaram em DMEM suplementado com dexametasona (10^{-7}) e ácido ascórbico 50 μ g/ml. Após quatro dias de cultivo, as células em suspensão foram descartadas e as células aderentes foram mantidas. Após a semeadura das células sobre a matriz de colágeno foram avaliados: proliferação celular por meio de digestão enzimática, mensuração da atividade da fosfatase alcalina por meio de um kit específico de reação fotométrica e o grau de mineralização do colágeno pela coloração do Von-Kossa. Os resultados apontaram para o fato de que o TGF-beta1 inibe a indução da BMP-2 sobre a fosfatase alcalina, e que este processo não está inteiramente esclarecido. A BMP-2 induziu os osteoblastos a se ligarem ao

receptor sobre as células tronco em uma cascata que envolve a fosforilação de trans-ativadores específicos, SMAD 1, 5 e 8 associadas com a SMAD 4.

CHANG *et al.*(2002) avaliaram a diversidade, diferenciação topográfica e memória posicional de fibroblastos humanos, realizando uma cultura primária de fibroblastos dérmicos , onde após a quinta sub-cultura as células foram avaliadas por imunofluorescência e procedimentos de *microarray* . Como conclusão os autores relataram que os fibroblastos de locais diferentes possuem diferenciação morfológica, sendo a expressão genômica um fator também de diferenciação entre os diversos tipos celulares. A memória posicional dos fibroblastos advém da sinalização molecular e das proteínas extra-celulares as quais enviam sinais de “endereço de casa” para as células. O código de endereço celular e os seus motivos continuam sendo objeto de estudo pelos autores.

GHAHARY *et al.* (2002) avaliaram o mecanismo pelo qual fibroblastos dérmicos respondem diretamente ao TGF- β 1 latente. Testaram ainda a eficácia do TGF- β 1 latente ou latente associados a membranas isoladas de fibroblastos normais, e fibroblastos transfectados com a forma latente do TGF- β 1. As células transfectadas produziram 19 vezes mais quantidade de TGF- β 1 que as células controle. O meio de cultura das células transfectadas foi utilizado para experimentos de proliferação. Os fibroblastos tratados com TGF- β 1 na forma latente e na forma ativa mostraram um aumento significativo na proliferação celular em resposta a baixas concentrações do TGF- β 1 ativo; porém, concentrações elevadas do mesmo, inibiram a proliferação dos fibroblastos. A proliferação de células

epiteliais foi significativamente inibida por meio contendo membranas celulares de determinados tipos de fibroblastos associados ao TGF- β 1 latente. Esse efeito foi dose-dependente. Os autores chegaram à conclusão que o TGF- β 1 latente pode modular diretamente a proliferação celular de células que possuem um mecanismo de ativação de TGF- β 1 associado à membrana celular.

THAWEBOON *et al.* (2002) atestaram que os dentes por meio da sua polpa são fontes de células indiferenciadas. Os autores investigaram o comportamento de fibroblastos da polpa dental *in vitro* na presença de chumbo. Foram isoladas células de polpa de indivíduos jovens e cultivadas e subsequentemente tratadas com glutamina que foram avaliadas quanto a proliferação celular, produção protéica, procolágeno tipo I e produção de osteocalcina. A estimulação da proliferação celular, a diminuição do conteúdo protéico e a redução do colágeno tipo I e produção da osteocalcina, foram atribuídos pelos autores à presença do chumbo na polpa dental.

GRON *et al.* (2002) com o propósito de detectar as diferenças entre as sub-populações de fibroblastos, avaliaram a produção de fator de crescimento hepático e de fator de crescimento de queratinócitos os quais são liberados pela cultura de fibroblastos quando na co-cultura com queratinócitos, sendo este comportamento similar em fibroblastos da mucosa oral, periodontal e dérmicos, as quais poderiam explicar as variações regionais no crescimento epitelial e na reparação tecidual. Fibroblastos epiteliais normais foram cultivados sobre poliestireno ou

mantidos em matriz de colágeno e estimulados com cultura de queratinócitos, todos os três tipos de fibroblastos de maneira geral aumentaram seu HGF e KGF. Quando as células foram mantidas em colágeno, o nível de HGF e KGF estava diminuído em fibroblastos orais a indução após a estimulação manteve o mesmo nível do cultivo sobre o poliestireno. Os resultados demonstraram que a secreção de HGF e KGF em ambos os fibroblastos não estimulados e na co-cultura com queratinócitos, de maneira geral os fibroblastos periodontais tinham os maiores níveis de produção de citocinas.

CHEN *et al.* (2004) investigaram a possibilidade de se utilizar um arcabouço híbrido de colágeno-PLGA para a engenharia tecidual da pele, foi realizada uma cultura primária de fibroblastos dérmicos, onde após obtenção do número de células necessárias que foram semeadas sobre os arcabouços. Após cinco dias de cultura, os arcabouços híbridos foram aplicados em lesões de pele de ratos atímicos. A avaliação foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Os autores concluíram que houve aderência dos fibroblastos na malha híbrida maior que no arcabouço de PLGA, isto foi atribuído ao colágeno presente na malha híbrida.

MAEDA *et al.* (2004) utilizaram um composto recentemente desenvolvido, denominado SB431542, o qual tem mostrado inibição na atividade da fosfatase alcalina quinase. Foi descoberto também que este composto aumenta a diferenciação mioblástica e osteoblástica na fase de maturação. Foram avaliados a relação do SB431542 na promoção da atividade osteoblástica, regulação dos marcadores osteoblásticos pela BMP-4 e SB431542, expressão de TGF-beta e seus receptores durante a

diferenciação osteoblástica. Os autores relataram a influência positiva deste composto na atividade osteoblástica em todas as avaliações realizadas.

WANG *et al.* (2004) avaliaram filmes de poli (3-hidroxi-butirato) (PHB), poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBHHx) consistindo de 5%, 12% e 20% de hidroxianoato(HHx), respectivamente, sendo que foram avaliados em aplicações biomecânicas em comparação com o poli(L-lático) (PLA). Com o aumento do conteúdo de HHx no PHBHHx, a superfície do polímero mudou de acordo com as concentrações. Todos os PHBHHx, mostraram muita afinidade com proteínas e biocompatibilidade. Os autores relataram que fibroblastos e osteoblastos, tiveram diferentes respostas para estes polímeros, obtendo melhor biocompatibilidade que em relação ao PLA. Concluíram que estes polímeros com suas propriedades mecânicas ajustadas para o alongamento e o possível ajuste à biocompatibilidade, poderá ser utilizado em diferentes tecidos com diferentes tipos celulares.

PHILLIPS *et al.* (2005) destacaram que os glucocorticóides tem um complexo efeito estimulante e inibitório sobre o metabolismo ósseo. A sinalização do glucocorticóide endógeno é necessário para uma formação *in vivo*, e glucocorticóides sintéticos, como a dexametasona, promovem a diferenciação osteoblástica na maioria dos sistemas *in vitro*. O mecanismo pelo qual estes hormônios induzem osteogênese permanece pobremente compreendido. Os autores demonstraram que a ação coordenada da dexametasona e a transcrição osteogênica pelos fatores Runx2/Cbfa1 induzem sinergicamente osteocalcina e a sialoproteína. A dexametasona

diminui os níveis de Runx-2 fosfoserina, particularmente sobre Ser125, em paralelo possui a regulação da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK) fosfatase-1, a inibição desta proteína, sugere que a dexametasona modula a Runx-2 fosforilação via MKP-1. Estes resultados indicam que a dexametasona induziu a osteogênese e pelo menos em uma parte isto se deveu a fosforilação da Runx-2.

ZHOU, YATES, GLOWACKI (2005) avaliaram a hipótese de que osso desmineralizado estimula condrogênese ou osteogênese de células da medula óssea humana dependente das condições de cultura. A diferenciação foi avaliada com histoquímica tecido específica, bioquímica e PCR-RT. Foram utilizadas esponjas de colágeno porosas com oito milímetros de diâmetros, semeadas com fibroblastos dérmicos provenientes de cultura primária. Foram realizadas as seguintes avaliações: análise histológica, avaliação da atividade da fosfatase alcalina PCR-RT e ensaio genético. Os autores concluíram que em cultura, as células da medula óssea podem se diferenciar em condroblastos quando tratadas com TGF-beta, as esponjas de colágeno apresentaram diferenciação celular, o que poderia ser devido a presença de colágeno.

JANSSENS, JANSSENS, VAN HUL (2005) avaliaram o TGF-beta1 e o consideraram um fator de crescimento que está diretamente implicado no controle da proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência. A sua influência ocorreu nos diversos processos como a embriogênese, a angiogênese, a inflamação e a reparação tecidual. No tecido ósseo, TGF-beta1 tem um papel no desenvolvimento e manutenção,

afetando ambos a cartilagem e metabolismo ósseo. Devido ao fato de afetar ambas as células, osteoblasto e osteoclasto. O TGF-beta1 é um dos mais importantes fatores no ambiente ósseo, ajudando a manter o equilíbrio dinâmico de reabsorção e formação óssea. Esta capacidade de estimular tanto a osteoclasto como osteoblastos é uma das desvantagens em se utilizar terapeuticamente, com a sua meia-vida curta de cerca de 2 minutos e por ultimo o TGF- β 1 participa de várias funções sistêmicas, o que poderia causar danos imprevisíveis.

FARHADI *et al.* (2005) avaliaram a hipótese de que o fator de crescimento de fibroblastos, FGF-2 pode estimular a produção de células estromais da medula óssea a produzirem BMP-2, TGF β 1 e VEGF. Foram cultivadas células da medula óssea de seis doadores e cultivadas em meio osteogênico contendo ácido ascórbico, beta-glicerofosfato e dexametasona. Após, as células foram transportadas para cultivo em meio livre de soro com várias concentrações de FGF-2. Foram realizadas as seguintes avaliações: quantificação de TGF- β 1 e VEGF por PCR-RT e quantidade no sobrenadante por teste ELISA. Os resultados indicaram que o FGF-2 aumenta a expressão de BMP-2, TGF- β 1 e VEGF em tecido ósseo humano.

BELOTI & ROSA (2005) avaliaram a diferenciação osteoblástica das células da medula óssea sob condições de contínua e descontínua utilização de dexametasona. Relataram que a utilização da dexametasona induz a diferenciação osteoblástica em muitas linhagens celulares. Os autores utilizaram células primárias que foram cultivadas com e sem a

presença de dexametasona sendo as avaliações realizadas no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias. Foram avaliadas a viabilidade celular, proteína total, atividade da fosfatase alcalina e formação de estrutura mineralizada. A dexametasona não afetou a viabilidade celular e a proteína total, mas reduziu o número de células. A atividade da fosfatase alcalina e a formação de estrutura mineralizada aumentaram na primeira passagem, em comparação com os grupos que não receberam dexametasona. Os resultados deste estudo indicaram que para células da medula óssea, a presença contínua de dexametasona não pareceu influenciar o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, mas a presença de dexametasona na primeira passagem permite a expressão da diferenciação osteoblástica pela redução do número de células e aumento da atividade da fosfatase alcalina.

VERNON *et al.* (2005) com o propósito de avaliar a performance de membranas de colágeno como arcabouços para o suporte celular, utilizaram cultura primária de fibroblastos dérmicos, mantidos em cultura até a décima sub-cultura, sendo após semeados na membrana de colágeno. As membranas foram modificadas segundo a sua topografia, foram realizados microcavidades para avaliar a adesão celular. As avaliações realizadas foram: microscopia eletrônica de varredura, fluorescência dos filamentos de actina, medição do alinhamento celular, proliferação celular. Os autores concluíram que as membranas de colágeno obtiveram uma boa adesão e as micro-cavidades com menos de $0,1\mu\text{m}$ obtiveram melhores resultados.

HEE *et al.* (2006) avaliaram a expressão de marcadores de diferenciação osteogênica em fibroblastos dérmicos humanos e sua influência sobre arcabouços tri-dimensionais, utilizando fibroblastos dérmicos humanos neonatais semeados sobre arcabouço de beta-tricálciofosfato(TCP) e arcabouço de ácido poli(lático) onde foram avaliados a degradação dos arcabouços, expressão gênica, bioquímica, histologia e imunohistoquímica. Os autores concluíram que fibroblastos dérmicos tem o potencial de servir como fonte para engenharia tecidual de tecido ósseo, a vitamina D3 foi estabelecida como fator osteogênico, dos arcabouços avaliados a beta-TCP teve um aumento de proliferação de células em relação ao PLA.

SUMITA *et al.* (2006) avaliaram o comportamento da esponja de colágeno como um arcabouço para engenharia tecidual do dente, destacaram que a estrutura pode ser regenerada pela semeadura das células sobre malhas de PLGA, embora o sucesso tenha sempre sido baixo. Os autores realizaram cultura primária de polpa de molares de porcos, expandiram as células e as semearam sobre esponjas de colágeno e malha de PLGA. Os arcabouços foram avaliados na adesão celular e na atividade da fosfatase alcalina *in vitro*. A análise *in vivo* foi realizada implantando os arcabouços no omento do rato para avaliação em 25 semanas. Após 24 horas a atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior para as esponjas de colágeno do que para o PLGA, a área mineralizada foi também maior nas esponjas de colágeno. Os resultados *in vivo* mostraram conclusivamente que esponjas de colágeno obtiveram maior percentagem de sucesso.

CAMPANER *et al.* (2006) avaliaram a influência do fator de crescimento transformante beta-1 (TGF-beta1) nas cicatrizes hipertróficas e quelóides. Neste estudo, os autores superexpressaram o TGF-beta1 em fibroblastos e caracterizaram seu papel. Fibroblastos dérmicos normais foram modificados geneticamente para superexpressar TGF-beta 1 como molécula latente ou como mutante ativa. A secreção de TGF-beta 1 foi medida na proliferação celular e na expressão de alfa actina. Fibroblatos foram implantados intradermicamente em camundongos atímicos e a formação de tecido fibroso foi analisada por histologia e imunohistoquímica. Fibroblastos geneticamente modificados secretaram aproximadamente 20 vezes mais TGF-beta1 que as células controle, mas somente células mutantes secretaram de forma ativa. Os autores concluíram que a regulação do TGF-beta 1 por fibroblastos pode ser necessária, mas não é suficiente para cicatrização excessiva.

PHILLIPS *et al.* (2006) com o objetivo de avaliar a habilidade de três arcabouços comuns e disponíveis comercialmente de suportar *in vitro* uma matriz mineralizada quando semeada com fibroblastos que expressam Runx-2. Os autores realizaram uma cultura primária de fibroblastos de ratos Wistar por digestão enzimática. As células foram semeadas sobre esponja de PLGA, PCL e esponja de colágeno onde foram realizadas as seguintes avaliações: viabilidade celular por microscopia confocal, conteúdo de DNA por PCR-RT, tomografia micro-computadorizada, espectroscopia e histologia. Os autores demonstraram que o potencial osteogênico dos fibroblastos que expressam Runx2 é altamente dependente das propriedades do arcabouço, foi verificado um aumento da deposição de minerais sobre a membrana de PLGA.

JAWORSKI & KLAPPERICH (2006) no intuito de verificar como as células respondem a um meio ambiente tri-dimensional composto de colágeno-glicosaminoglicano (GAG), cultivaram fibroblastos humanos de bexiga cultivados em DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos. As avaliações realizadas foram a histologia, o isolamento de RNA e a hibridização e o PCR-RT. Como conclusão verificaram que existiram importantes diferenças entre culturas 2D e 3D, além da simples diferença estrutural. A área de superfície tem sido mostrada como um fator que afeta a percentagem de aderência nas malhas de colágeno-GAG de diferentes tamanhos de poros. Estes resultados suportam a idéia de que a geometria e as características topográficas de um arcabouço de engenharia tecidual são tão importantes quanto as características químicas e também da resposta biológica.

BERHARDT *et al.* (2006) cultivaram durante 28 dias células da medula óssea em meio osteogênico contendo dexametasona e depois semeadas sobre esponja de colágeno, membrana de poliestireno e hidroxiapatita nanocristalina com o objetivo de avaliar a proliferação e a diferenciação osteogênica. A avaliação do número de células foi realizada por DHL e a proliferação celular sobre ao colágeno mineralizado foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e medição atividade da fosfatase alcalina por conteúdo protéico no meio de cultura. Os autores concluíram que um material sintético que mimetiza a composição e estrutura da matriz extra-celular do osso a qual consiste de colágeno tipo I, fibrilas hidroxiapatita mineralizada nano cristalina, mostrou influência na diferenciação osteogênica.

THOLPADY *et al.* (2007) relataram que as teorias que explicam as causas da craniosinostose, mencionam há mais de 15 anos o papel das forças tensionais no desenvolvimento das suturas cranianas. Utilizando ratos, como animais de experimentação que normalmente tem a fusão da sutura intra-frontal posterior quando submetidos a uma força tensional de 3 mN por 30 minutos diários. Os autores avaliaram a proliferação e a apoptose celular, bem como os componentes de sinalização do TGF beta, em suturas fusionadas em ratos. Concluíram que a manutenção da sutura por forças mecânicas tem relação com a modulação da atividade celular e da expressão protéica. Os seus estudos demonstraram uma reciprocidade entre a atividade mecânica e o estado morfológico. As mudanças nos TGF-betas dos fibroblastos, pode ter relação com fusão das suturas, demonstrando que a força tensional nas suturas pode ser responsável pela modulação deste fator de crescimento.

KOZHEVNIKOVA, MIKAELIAN, STAROSTIN (2008) relataram em seu estudo a preocupação com os mecanismos de genética molecular da diferenciação osteogênica de células da medula a qual é controlada por um complexo mecanismo de sinalização protéica e fatores de transcrição. A interação de fatores é o mais importante caminho de sinalização nos diferentes estágios da diferenciação. Os autores destacaram o fato de ao contrario de outros tipos de diferenciação, usualmente acompanhadas de alteração fenotípica, os osteoblastos cultivados permanecem fenotipicamente similares a fibroblastos até os estágios terminais da sua diferenciação. Outro fato importante seria que apenas a osteocalcina pode ser considerada um verdadeiro marcador de osteoblastos maduros.

MÉTODOS

4. Métodos

4.1 Aprovação do Projeto

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo sob o número 1167/06 (Anexo 1). Os pacientes doadores ou seus responsáveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para obtenção de pele (Apêndice1).

4.2 Tipo de Pesquisa

O presente estudo é experimental *in vitro*. Os procedimentos foram realizados em triplicata no laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

4.3 Amostra

Foram utilizados fibroblastos dérmicos humanos cultivados em esponja de colágeno, sendo avaliada a atividade da fosfatase alcalina (FAL) e a quantidade de osteocalcina (OC) que são marcadores da atividade osteoblástica. A interação das células com a esponja de colágeno foi verificada pela avaliação histológica com coloração de azul de toluidina e fuccina. Para avaliar a presença ou não de depósitos mineralizados de cálcio na esponja de colágeno foi realizado a coloração de Von Kossa, a qual é específica para cálcio.

4.3.1 Distribuição dos Grupos

As esponjas cultivadas com fibroblastos foram distribuídas em quatro grupos de acordo com o meio de cultura utilizado: Controle, TGF- β 1, Osteog. e Osteog. TGF- β 1

4.4 Cultura de Fibroblastos Dérmicos Humanos

O isolamento e cultura de fibroblastos dérmicos humanos foi realizado a partir de fragmentos de pele descartados de procedimentos operatórios da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP.

O tecido coletado foi imediatamente imerso em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para o transporte até o laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica, e mantido à temperatura de 4°C, sendo manipulado nas seis horas subsequentes.

A cultura foi iniciada pelo método de explante onde cerca de 10 fragmentos, de aproximadamente 1mm² cada, foram retirados de cada fragmento de pele, e dispostos em espaços equidistantes na superfície da placa de cultura de 100mm de diâmetro (SIGMA-ALDRICH, USA), com 5 mL de meio de cultura em ambiente de fluxo laminar. As placas com os fragmentos são mantidas abertas dentro deste ambiente por cerca de 20 minutos para a secagem e fixação na placa. Após este período, foi acrescentado 5ml de meio próprio para cultivo de fibroblastos constituído de DMEM, 20% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone, Logan, Utah, EUA) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (100U de penicillina e 100 μ g de estreptomicina por ml) (Gibco, Grand Island, NY, EUA)).

As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas numa mistura gasosa de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, por cerca de 15 dias, tempo esse para a migração dos fibroblastos provenientes dos fragmentos para a placa de cultura. Foi utilizado cinco mililitros de meio de cultura em cada placa sendo a troca do meio de cultura realizada a cada 48 horas.

Quando a confluência de células na placa atingia 80%, foram realizadas novas passagens dos fibroblastos. Ao atingir a quarta passagem, as células foram utilizadas nos experimentos (CAMPANER *et al.*,2004; KEIRA *et al.*,2004).

4.5 Esponja de Colágeno

Foram utilizadas esponjas de colágeno bovino pré-fabricadas Lyostypt® produzida pela B.Braun S.A (Germany). Cada peça de esponja de colágeno possui a dimensão de 100X120X5mm com poros de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro, acondicionada em embalagem estéril (óxido de etileno) contendo quatro peças cada embalagem. A sua manipulação foi em ambiente estéril e controlado (fluxo de ar) e no momento do seu uso as peças de esponja foram cortadas em forma de disco de 16mm de diâmetro e 2mm de espessura sendo imediatamente inseridas nas placas de 24 poços (SIGMA-ALDRICH, USA) (Figura 1).

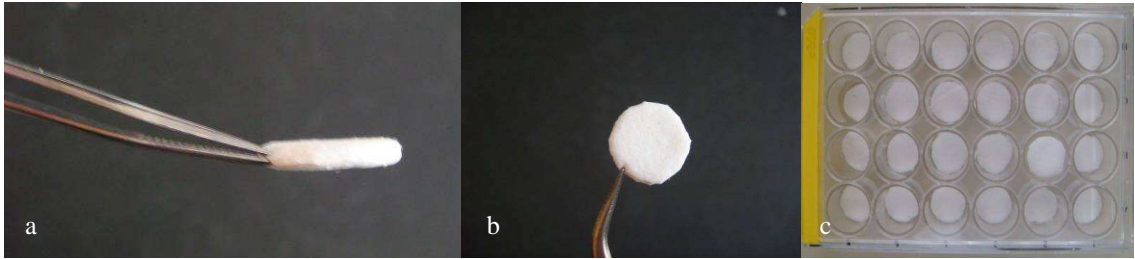


Figura1- Esponja de Colágeno: a- aspecto lateral, b- aspecto superior, c- placa de 24 poços com as esponjas de colágeno inseridas.

4.6 Meios de Cultura

O estudo foi realizado com dois principais tipos de meio de cultura, suplementados ou não com TGF- β 1. O primeiro tipo de meio foi constituído do meio EAGLE modificado por DULBECCO (DMEM) (alta taxa de glicose [4,5 g/L], L-glutamina [584 mg/L], piruvato de sódio [110 mg/L]), com soro fetal bovino a 10% e Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100 μ g/ml) e tamponado com bicarbonato de sódio (1N). O pH da solução foi ajustado para 7,2, sendo denominado de meio padrão.

O segundo tipo de meio foi constituído do meio padrão (DMEM) suplementado com Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100 μ g/ml), com soro fetal bovino a 10% e tamponado com bicarbonato de sódio (1N) acrescido de 0,5 μ g/ml de ácido ascórbico (SIGMA-ALDRICH, USA), 10 mmol/L β -glicerofosfato (RESEARCH INC., USA) e 10nmol/L dexametasona (DEX) (SIGMA-ALDRICH, USA), sendo denominado de meio osteogênico (BELOTI & ROSA 2005, COELHO & FERNANDES 2007a,b)

4.6.1 Suplementação com TGF- β 1

Foi realizada a suplementação dos meios de cultura padrão e osteogênico com TGF- β 1 recombinante humano (SIGMA-ALDRICH, USA) na concentração de 10ng/ml, formando assim os grupos TGF- β 1 e Osteog. TGF- β 1.

4.7 Grupos Experimentais

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizadas placas de 24 poços e uma densidade de células por poço de $2,5 \times 10^5$ células com 1 ml de cada tipo de meio de cultura por poço (Figura 2).

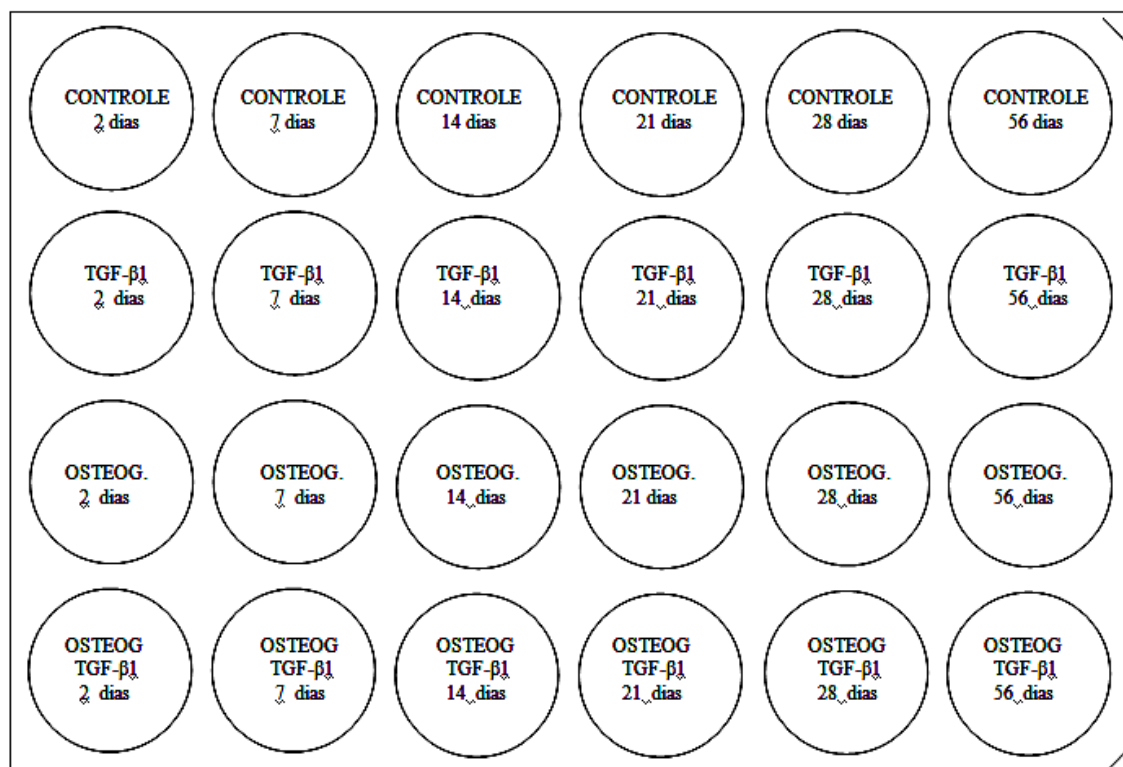


Figura 2- Esquema de distribuição dos grupos na placa de 24 poços

As células foram cultivadas por um total de 56 dias, sendo as avaliações realizadas com dois, sete, 14, 21, 28 e 56 dias após a semeadura das células, e a troca do meio de cultura das células foi realizada a cada 48 horas.

4.8 Avaliação da Diferenciação Celular

4.8.1 Atividade da Fosfatase Alcalina (FAL)

Em cada ponto de avaliação do estudo dois, sete, 14, 21, 28 e 56 dias de cultivo, o meio foi removido das placas de cultura e submetido ao estudo da atividade da fosfatase alcalina, por meio do Kit QuantiChrom® Alkaline Phosphatase Assay (DALP-250) (BioAssay Systems, CA, USA). Houve uma medição direta da atividade da fosfatase alcalina do meio, pela utilização do fosfato de p-nitrofenil que é hidrolisado pela fosfatase alcalina na cor amarela com absorvância aproximada de 405nm, sendo a intensidade da reação proporcional a atividade da enzima. Para tal, foram transferidos 200µl de água destilada e 200 µl de líquido calibrador (Kit) em uma placa de 96 poços. Transferidos 50µl do meio a ser analisado para os outros poços da placa. Pipetados 150µl da solução de trabalho (Kit) sobre os poços contendo o meio. A quantidade final em cada poço foi de 200µl. Fechada a tampa da placa gentilmente sem misturar, ela foi levada ao espectrofotômetro (Multiskan, CA USA) onde foi realizada a leitura em 405nm, após quatro minutos a placa foi inserida novamente no espectrofotômetro obtendo-se assim uma curva de atividade da fosfatase

alcalina. Para que os resultados fossem expressos em (IU/L) foi realizada a seguinte equação:

$$= \frac{(\text{DO amostra } t - \text{DO amostra } 0) \times 1000 \times \text{vol. reação}}{t \times \epsilon \times I \times \text{vol. da reação}}$$

DO *t*: densidade óptica da amostra após 4 minutos

DO *0*: densidade óptica da amostra no tempo 0

1000: o fator 1000 converte IU/mL em IU/L

Vol. Reação: volume total de cada poço (200µl)

t: tempo de incubação em minutos

ϵ : 18,75 mM⁻¹ x cm⁻¹

I: penetração da luz (DO calibrador – DO água) / ($\epsilon \times C$)

4.8.2 Quantidade de Osteocalcina (OC)

Em cada ponto de avaliação do estudo, o meio de cultura foi removido e utilizado o teste ELISA para a dosagem quantitativa de osteocalcina. O teste utilizado foi o Kit ELISA OSTEOCALCIN (ZYMED LAB, Inc CA USA). Para o preparo da solução 1: Solução Conjugada de Anticorpo-HRP, reconstituiu-se o *vial* 2 com 11 ml de água destilada, misturando levemente por dez minutos com poucos intervalos, evitando a formação de espuma. Para o preparo da solução 2 foi utilizado a solução standard contendo 16ng Gla-OC/ml e reconstituir o *vial* 3 com 1 ml de água destilada, misturou-se levemente por dez minutos. Após, foi pipetado 100µl da amostra de meio e mais 100 µl de solução 2 nos devidos poços da placa de 96 poços que acompanha o kit, mexeu-se levemente e cobriu-se a placa por duas horas à temperatura ambiente (Figura 3).

Removeu-se o meio dos poços e procedeu-se a lavagem por três vezes com 400µl de PBS, entre as lavagens verteu-se a placa sobre papel

estéril para remover completamente o líquido, em seguida pipetou-se 100µl da solução 1 por uma hora, após este tempo removeu-se a solução e lavou-se quatro vezes com PBS, adicionou-se 100 µl da solução substrato (vial 5) e aguardou-se cinco minutos, na sequência adicionou-se 100 µl da solução de interrupção e misturou-se gentilmente. O conjunto foi levado, imediatamente ao espectrofotômetro e a leitura realizada a um nível de absorbância de 450nm.

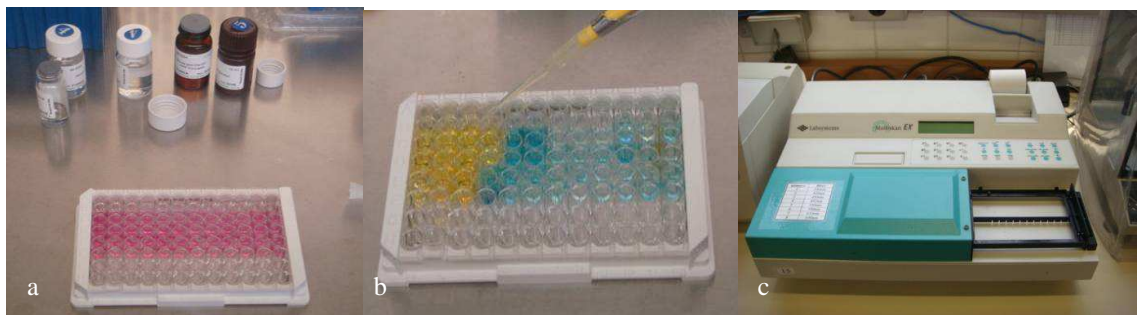


Figura 3- Avaliações: a- KIT para o teste de ELISA OSTEOCALCIN(ZYMED LAB, Inc CA USA), b- Placa de 96 poços utilizada no teste ELISA para osteocalcina mostrando a mudança de cor nos poços no momento da colocação da solução de interrupção, c- Espectrofotômetro Multiskan, CA USA.

4.9 Avaliação da Interação Célula/Esponja de Colágeno

As esponjas de colágeno cultivadas, foram removidas da placa de cultivo e transportadas para uma outra placa de 24 poços, sendo após fixadas com uma solução de glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 2% em

tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por imersão. Após um período de 12 horas as esponjas foram inseridas em uma mistura de ágar a 4% a uma temperatura de 50°C e em seguida deixou-se ficar em temperatura ambiente até o endurecimento do material.

Em seguida, procedeu-se a primeira lavagem com uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M por duas horas. Para a segunda fixação utilizou-se tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por duas horas. Uma segunda lavagem foi realizada com a imersão do material por três vezes com quinze minutos de duração em tampão de cacodilato de sódio 0,1M. Procedeu-se então a desidratação com banhos do material em etanol 70% duas vezes de dez minutos, etanol 90% duas vezes de dez minutos, etanol 100% quatro vezes de quinze minutos e por último com óxido de propileno duas vezes por quinze minutos.

A infiltração foi realizada com resina Embed 812 em uma proporção de 1:1 com óxido de propileno por 12 horas, com resina pura uma vez por oito horas, 12 horas, 4 horas e uma hora na estufa a 37°C. A inclusão e polimerização foi realizada a uma temperatura de 60°C por 46 horas. Os cortes foram realizados em um ultra-micrótomo com cortes semi-finos de 0,5µm. A coloração foi realizada com azul de toluidina aquosa 1% à quente e fuccina básica aquosa 0,1% à frio. Estes procedimentos foram realizados no centro de microscopia eletrônica (CEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.10 Avaliação dos Depósitos Mineralizados de Cálcio Fosfato

4.01.1 Método de VON KOSSA

Foram preparadas lâminas com cortes de 0,5µm de espessura da esponja de colágeno. Logo após, foi realizada a desparafinização utilizando-se xilol com subsequente hidratação com água destilada, sendo que a água foi trocada a cada banho sendo utilizado ao menos em dois banhos, as lâminas foram imersas em uma solução de nitrato de prata a 5%, por 30 a 60 minutos com exposição a luz ultra-violeta ou uma lâmpada incandescente de 100 W.

Na sequência as lâminas foram lavadas com água destilada, sendo após este procedimento lavadas com uma solução de tiosulfato de sódio a 5% por dois a três minutos, vigorosamente. À partir deste ponto, realizava-se a imersão da lâmina em um recipiente com o corante Nuclear Fast Red por cinco minutos, lavou-se em água destilada, e procedeu-se a desidratação rapidamente com três banhos com álcool absoluto com subsequente três banhos em xilol, cobriu-se a lâmina com uma lamínula e bálsamo. O protocolo de coloração de Von-Kossa para cálcio foi utilizado para demonstrar depósitos de cálcio ou sal de cálcio específico para o íon cálcio que possivelmente existiriam nas esponjas.

4.11 Análise Estatística

A análise de variância de Friedman foi utilizada para a avaliação dos resultados das triplicatas de cada grupo nos pontos de avaliação do estudo.

Para a comparação entre as médias das triplicatas entre os grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis.

Ficou previamente estabelecido em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade e ao término os valores da estatística foram apresentados em forma de tabelas e gráficos. Os valores significantes foram assinalados com asterisco (*).

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Atividade da Fosfatase Alcalina

Para determinar a atividade da fosfatase alcalina o valor da média da triplicata foi utilizado para as comparações estatísticas. Para demonstrar o comportamento da atividade da fosfatase alcalina no mesmo grupo nos pontos de caracterização da amostra, foi realizado teste de variância de Friedman, o qual demonstrou que nos grupos Controle e TGF- β 1 não houve diferença significativa entre os valores obtidos e nos grupos Osteog. e Osteog. TGF- β 1 e houve uma diferença significativa entre os valores encontrados (Tabela 1) e (Figura 4).

Tabela 1- Valores das médias da triplicata da quantificação da atividade da fosfatase alcalina (FAL) expressos em IU/L, medidos por teste fotométrico no espectrofotômetro a um nível de 405 nm.

TEMPO	GRUPOS							
	CONTROLE		TGF- β 1		OSTEOG.		OSTEOG. TGF- β 1	
DIAS	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
2	0,86	0,05	0,90	0,01	3,29	0,54	3,75	0,46
7	0,87	0,05	0,87	0,04	7,48	0,20	8,03	0,15
14	0,88	0,02	0,89	0,02	9,90	0,94	9,95	0,51
21	0,88	0,01	0,88	0,01	11,05	0,05	12,29	0,18
28	0,89	0,02	0,88	0,02	10,53	0,35	11,54	0,40
56	0,86	0,05	0,85	0,01	0,82	0,03	0,87	0,009

Análise da Variância de Friedman

Os valores de $p \leq 0,05$ estão assinalados por asterisco (*)

<u>CONTROLE</u>	<u>TGF-β1</u>	<u>OSTEOG.</u>	<u>OSTEOG. TGF-β1</u>
p 0,234	p 0,175	p 0,032 *	p 0,043*

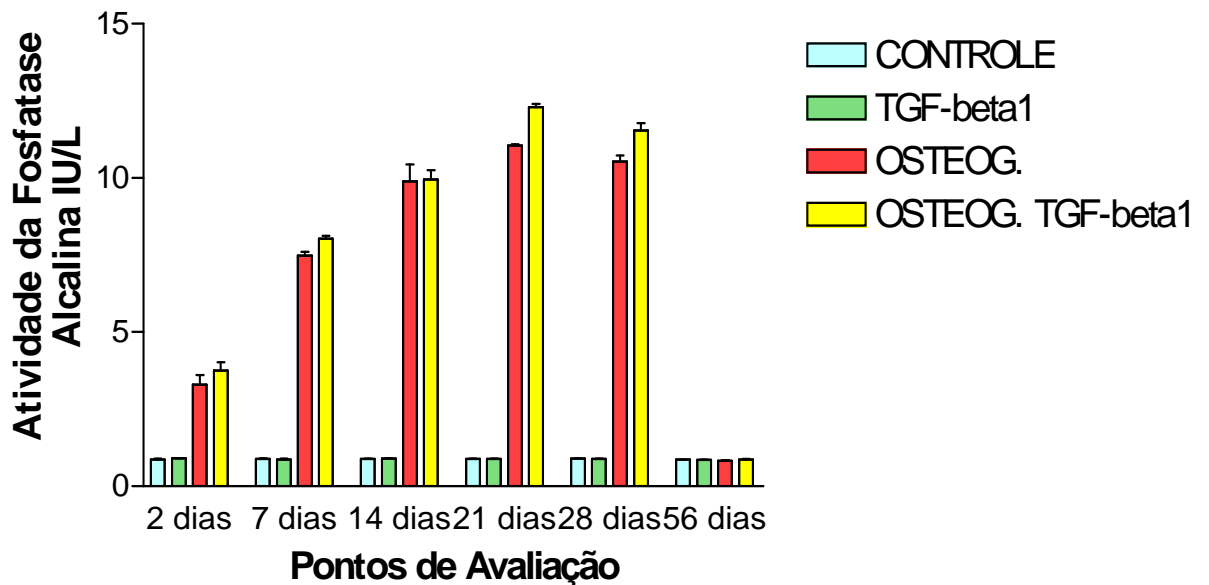


Figura 4. Valores das médias da triplicata da quantificação da atividade da FAL expressos em IU/L, medidos no espectrofotômetro a um nível de 405 nm.

Para a comparação da atividade da fosfatase alcalina entre os grupos verificadas em cada dia da caracterização da amostra, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis onde observou-se que os valores do grupo Controle não apresentaram diferenças significantes quando comparados com os valores do grupo TGF- β 1, e obtiveram diferenças significantes quando comparados com os valores do grupo Osteog. e Osteog. TGF- β 1, exceto nos valores encontrados para o 56° dia de cultura. Os valores do grupo Osteog. foram significativamente menores que os valores encontrados no grupo Osteog. TGF- β 1 em todas as avaliações exceto no 56° dia de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação estatística entre os valores das médias da triplicata da atividade da fosfatase alcalina (FAL) expressa em IU/L.

Grupos	Valor de p					
	Tempo de Cultura (dias)					
	2	7	14	21	28	56
CONTROLE vs TGF- β 1	0,91	0,21	0,97	0,86	0,32	0,12
CONTROLE vs OSTEOG.	0,01*	0,02*	0,03*	0,01*	0,01*	0,34
CONTROLE vs OSTEOG TGF- β 1	0,04*	0,03*	0,03*	0,04*	0,03*	0,76
TGF- β 1 vs OSTEOG.	0,03*	0,03*	0,02*	0,04*	0,04*	0,54
TGF- β 1 vs OSTEOG. TGF- β 1	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,01*	0,20
OSTEOG. vs OSTEOG. TGF- β 1	0,05*	0,04*	0,04*	0,03*	0,04*	0,37

Teste de Kruskal-Wallis

Os valores de $p \leq 0,05$ foram assinalados por asterisco (*).

5.2 Quantidade de Osteocalcina

Para determinar a quantidade de osteocalcina o valor da média da triplicata foi utilizado para as comparações estatísticas. Para demonstrar a variação da quantidade de osteocalcina no mesmo grupo nos pontos de caracterização da amostra, foi realizado teste de variância de Friedman, o qual demonstrou que nos grupos Controle e TGF- β 1 não houve diferença significativa entre os valores obtidos e nos grupos Osteog. e Osteog. TGF- β 1 houve uma diferença significativa entre os valores encontrados (Tabela 3) e (Figura 5).

Tabela 3- Valores das médias das triplicatas da quantidade de osteocalcina (OC) expressa em ng/ml, medidos por ELISA no espectrofotômetro a um nível de 450nm.

TEMPO		GRUPOS						
DIAS	CONTROLE		TGF- β 1		OSTEOG.		OSTEOG. TGF- β 1	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
2	0,11	0,01	0,11	0,01	2,74	0,16	2,26	0,35
7	0,11	0,01	0,11	0,01	7,30	0,51	8,21	0,12
14	0,11	0,02	0,10	0,006	15,55	1,35	17,34	0,64
21	0,15	0,01	0,12	0,01	23,17	0,78	25,61	0,98
28	0,11	0,01	0,11	0,01	20,14	0,16	22,21	0,20
56	0,11	0,01	0,12	0,01	0,13	0,03	0,12	0,01

Análise da Variância de Friedman

Os valores de $p \leq 0,05$ estão assinalados por asterisco (*)

CONTROLE
 p 0,375

TGF- β 1
 p 0,218

OSTEOG.
 p 0,01 *

OSTEOG. TGF- β 1
 p 0,037*

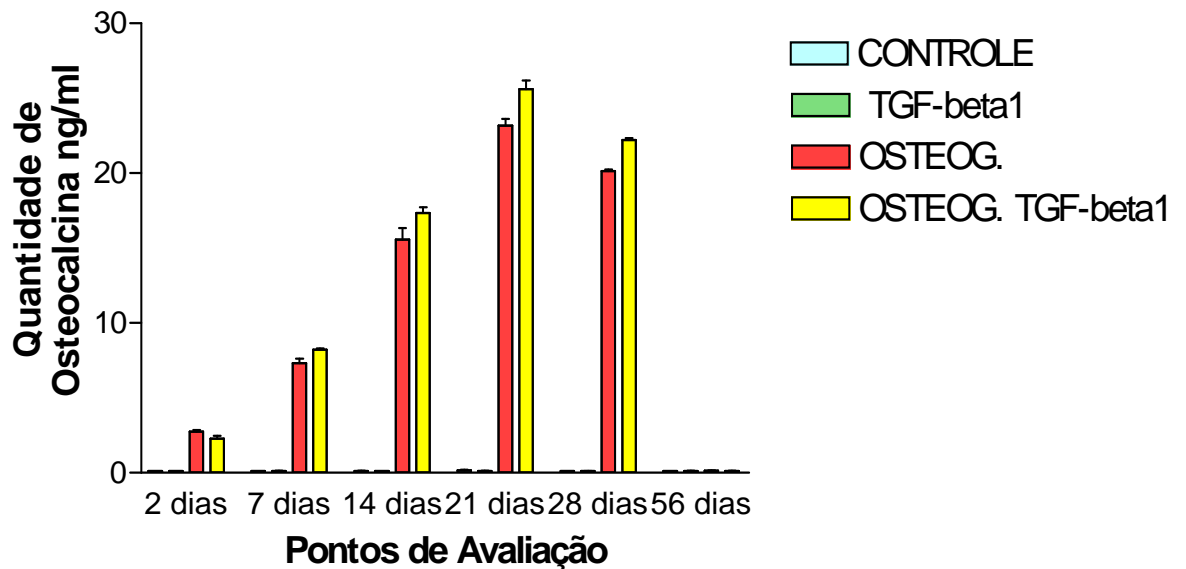


Figura 5. Valores das médias das triplicatas da quantidade de osteocalcina (OC) expressa em ng/ml, medidos pelo teste ELISA no espectrofotômetro a um nível de 450nm.

Para a comparação dos valores da quantidade de osteocalcina entre os grupos verificadas em cada dia da caracterização da amostra, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis onde observou-se que os valores do grupo Controle não apresentaram diferenças significantes quando comparados com os valores do grupo TGF- β 1, e obtiveram diferenças significantes quando comparados com os valores do grupo Osteog. e Osteog. TGF- β 1, exceto nos valores encontrados para o 56^o dia de cultura. Os valores do grupo Osteog. foram significativamente menores que os valores encontrados no grupo Osteog. TGF- β 1 em todas as avaliações exceto no 56^o dia de cultura (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação estatística entre os valores das médias das triplicatas da atividade da osteocalcina (OC) expressa em ng/ml..

Grupos	Valor de <i>p</i>					
	Tempo de Cultura (dias)					
	2	7	14	21	28	56
CONTROLE vs TGF-β1	0,75	0,32	0,48	0,28	0,56	0,62
CONTROLE vs OSTEOG.	0,01*	0,01*	0,02*	0,03*	0,03*	0,41
CONTROLE vs OSTEOG TGF-β1	0,03*	0,02*	0,02*	0,04*	0,04*	0,28
TGF- β1 vs OSTEOG.	0,04*	0,03*	0,03*	0,05*	0,04*	0,51
TGF- β1 vs OSTEOG. TGF- β1	0,02*	0,01*	0,02*	0,04*	0,04*	0,17
OSTEOG. vs OSTEOG. TGF- β1	0,04*	0,03*	0,03*	0,04*	0,03*	0,32

Teste de Kruskal-Wallis

Os valores de $p \leq 0,05$ foram assinalados por asterisco (*).

5.3 Avaliação da Interação Célula/Esponja de Colágeno

Para a avaliação da interação das células com a esponja de colágeno foi realizada a análise histológica com a coloração com azul de toluidina 1% e fuccina 0,1% . Pôde-se observar o mesmo comportamento em todos os grupos, onde as células permaneceram na superfície da esponja no início dos experimentos, havendo uma penetração gradual das células para o interior da esponja de colágeno até o 28° dia de cultura, permanecendo desta maneira até o final dos experimentos. (Figuras 6 a 11).

5.4 Depósitos Mineralizados de Cálcio Fosfato

Para determinação da presença ou não de depósitos mineralizados de cálcio fosfato na esponja de colágeno cultivada, foi realizada a avaliação pelo teste de Von Kossa, o qual demonstrou que não houve evidência da presença de depósitos mineralizados nos grupos Controle e TGF- β 1 e houve evidência da presença de depósitos mineralizados nos grupos Osteog. e Osteog. TGF- β 1 a partir do 14^o dia até o o 56^o dia de cultura (Tabela 5) e (Figuras 12 a 17).

Tabela 5- Resultados da coloração de Von Kossa, em relação à presença de depósitos de cálcio fosfato na esponja de colágeno.

Tempo de Cultura (dias)	CONTROLE	TGF-beta1	OSTEOG.	OSTEOG. TGFbeta1
2	-	-	-	-
7	-	-	-	-
14	-	-	+	+
21	-	-	+	+
28	-	-	+	+
56	-	-	+	+

(-) ausência de depósitos mineralizados de cálcio fosfato

(+) presença de depósitos mineralizados de cálcio fosfato

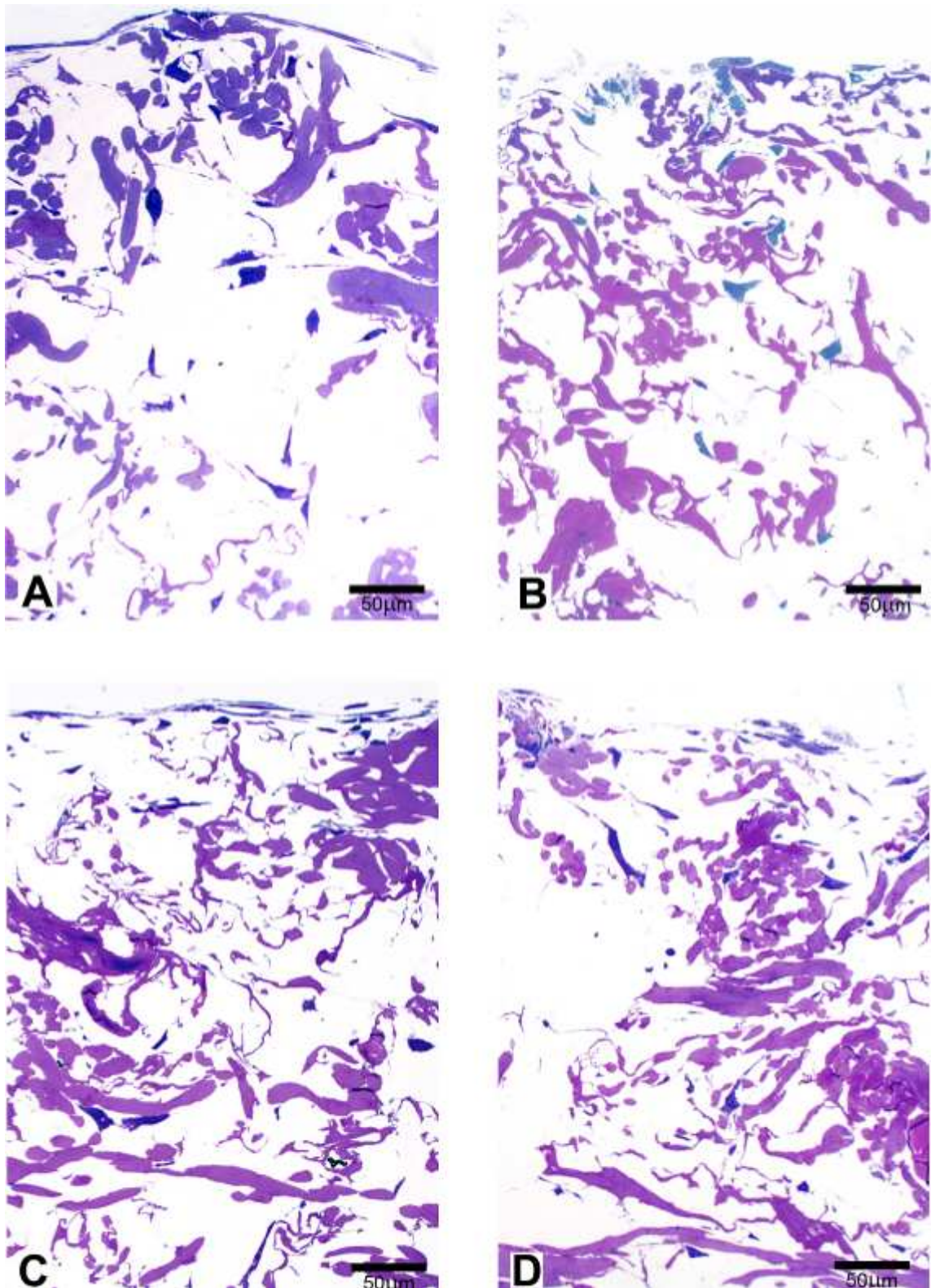


Figura 6- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após dois dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina .a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog.TGF- β 1.

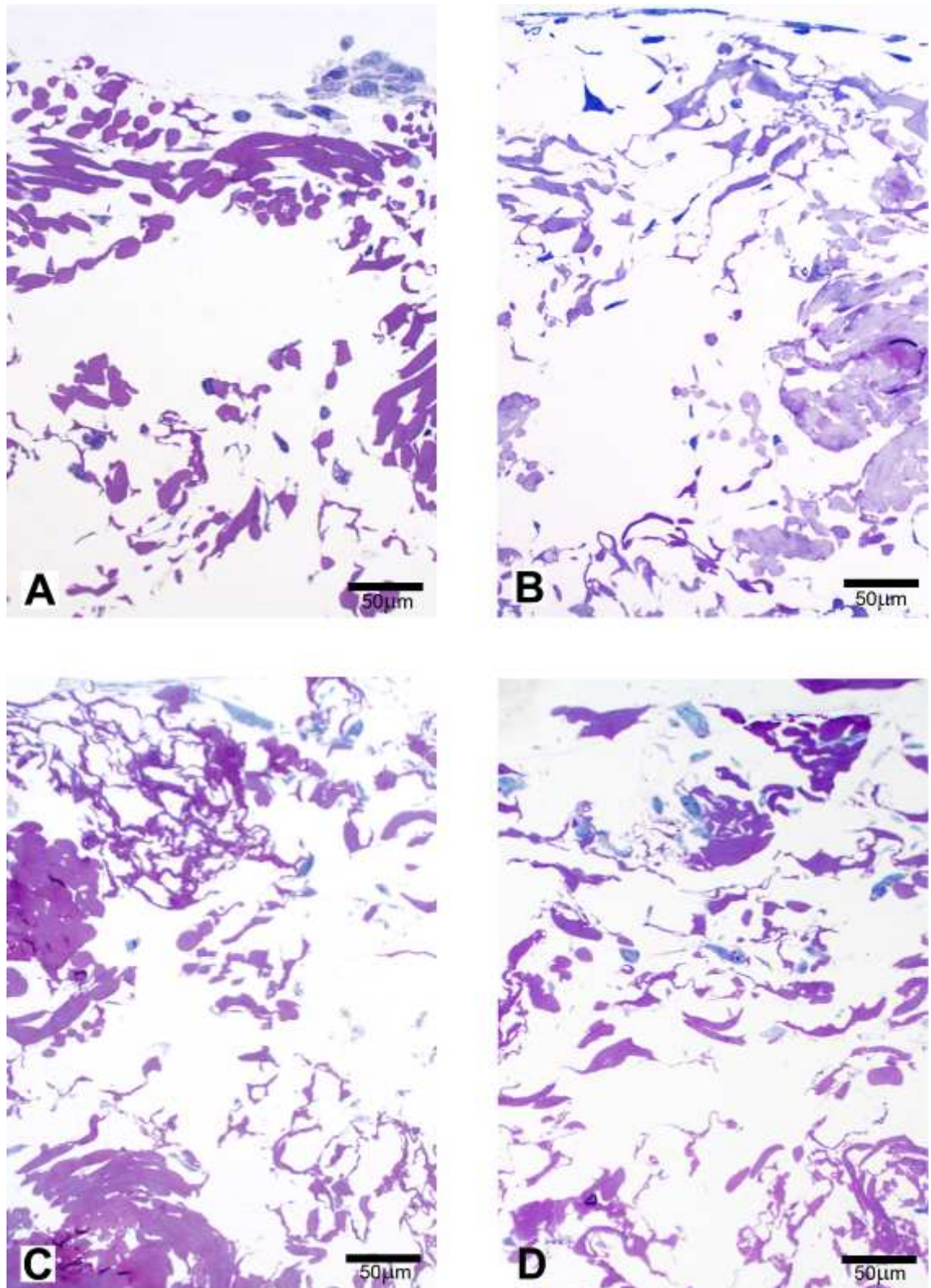


Figura 7- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após sete dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina .a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog.TGF- β 1.

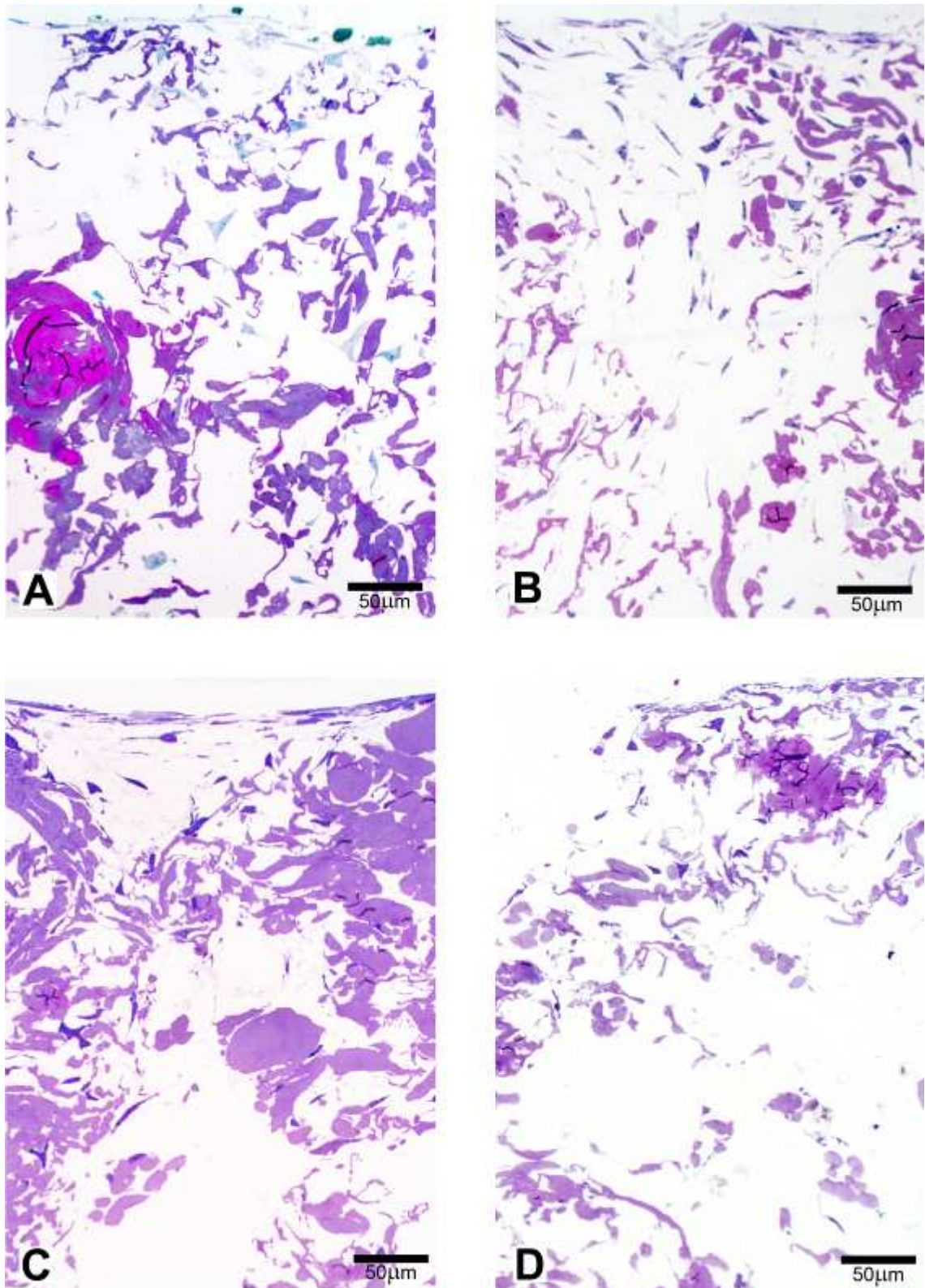


Figura 8- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 14 dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina. a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF- β 1.

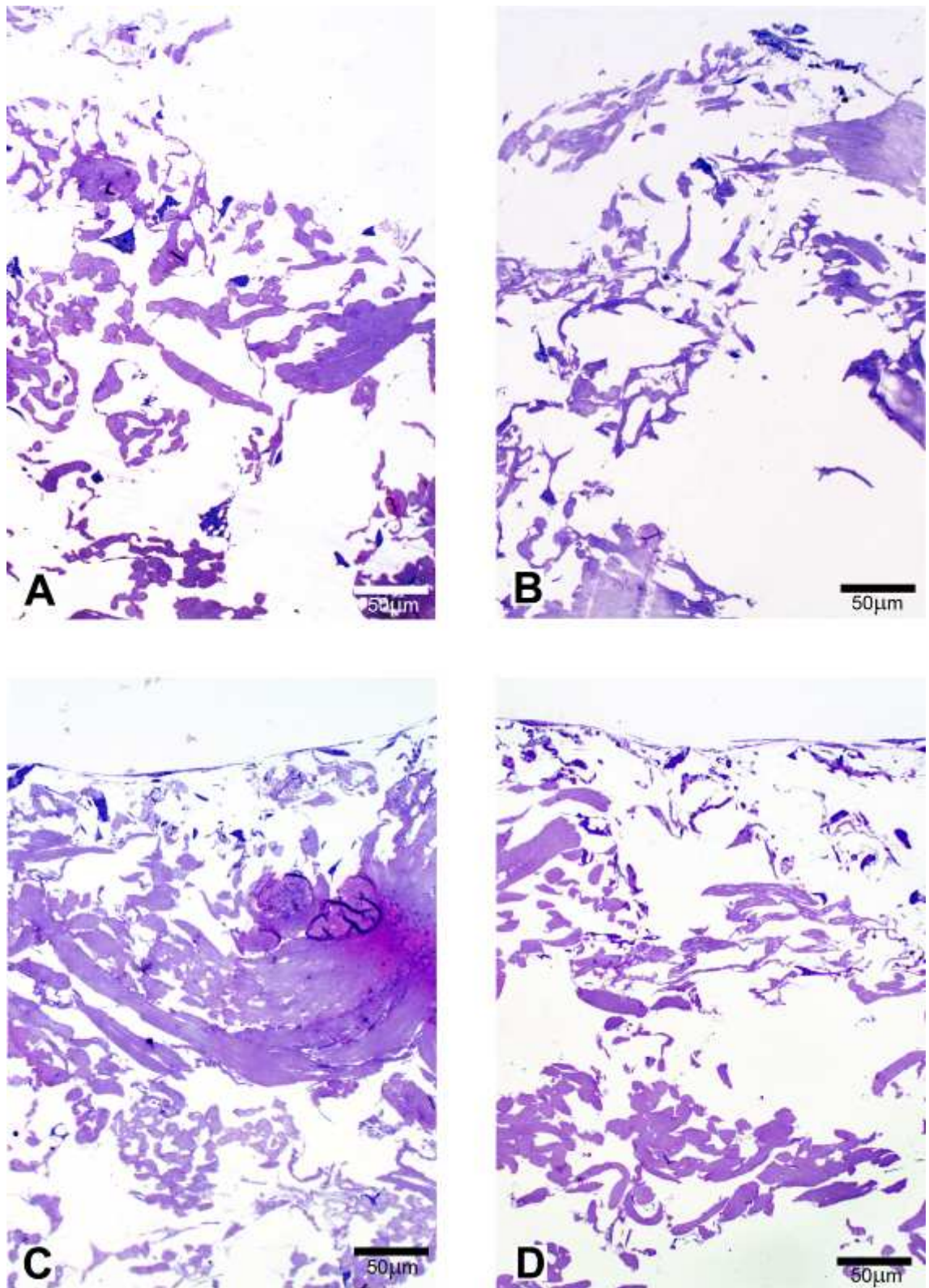


Figura 9- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 21 dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina .a) grupo Controle b) grupo TGF-β1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF-β1.

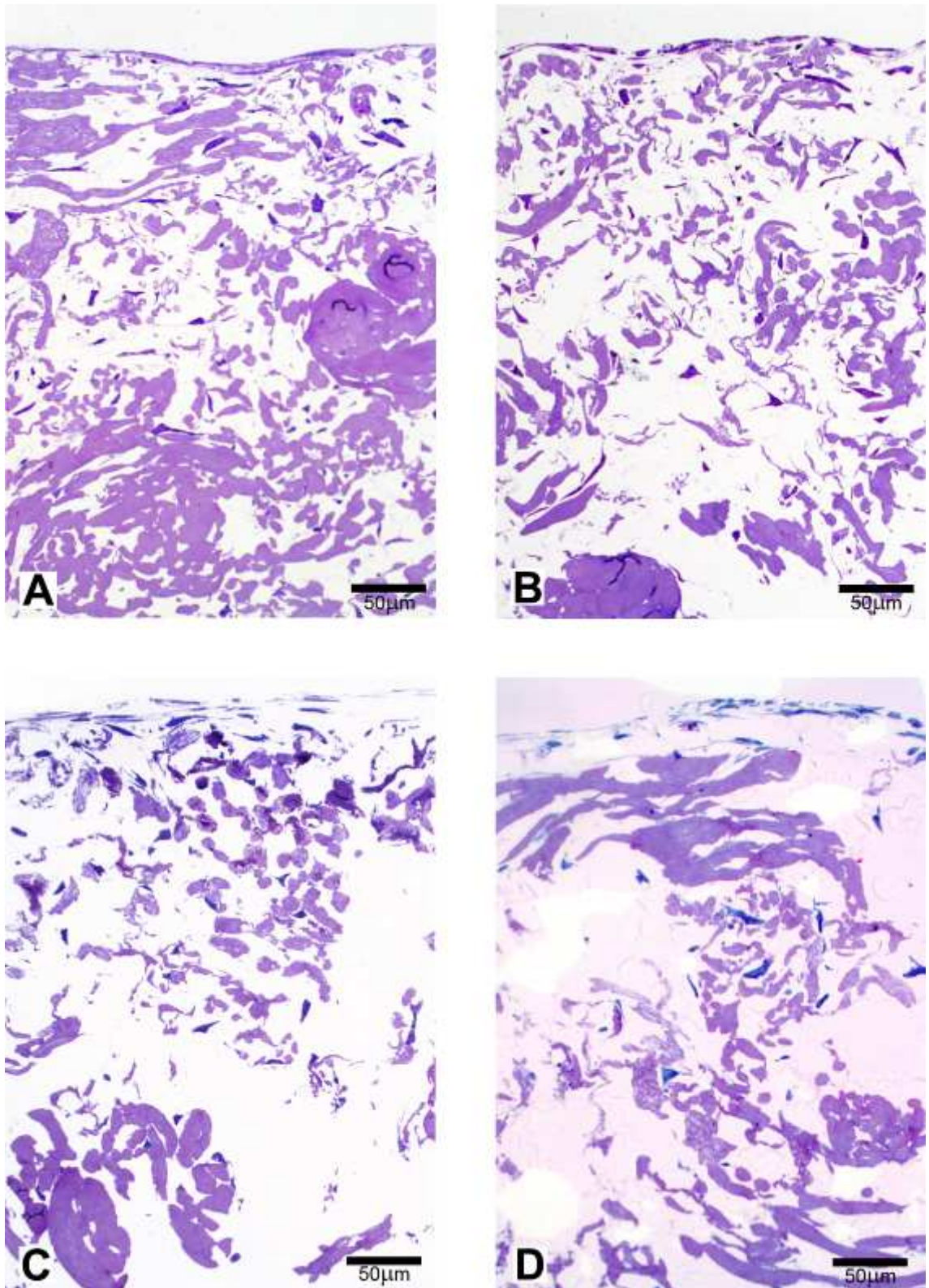


Figura 10- Aspecto microscópico da esponja colágeno após 28 dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina. a) grupo Controle b) grupo TGF-β1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF-β1.

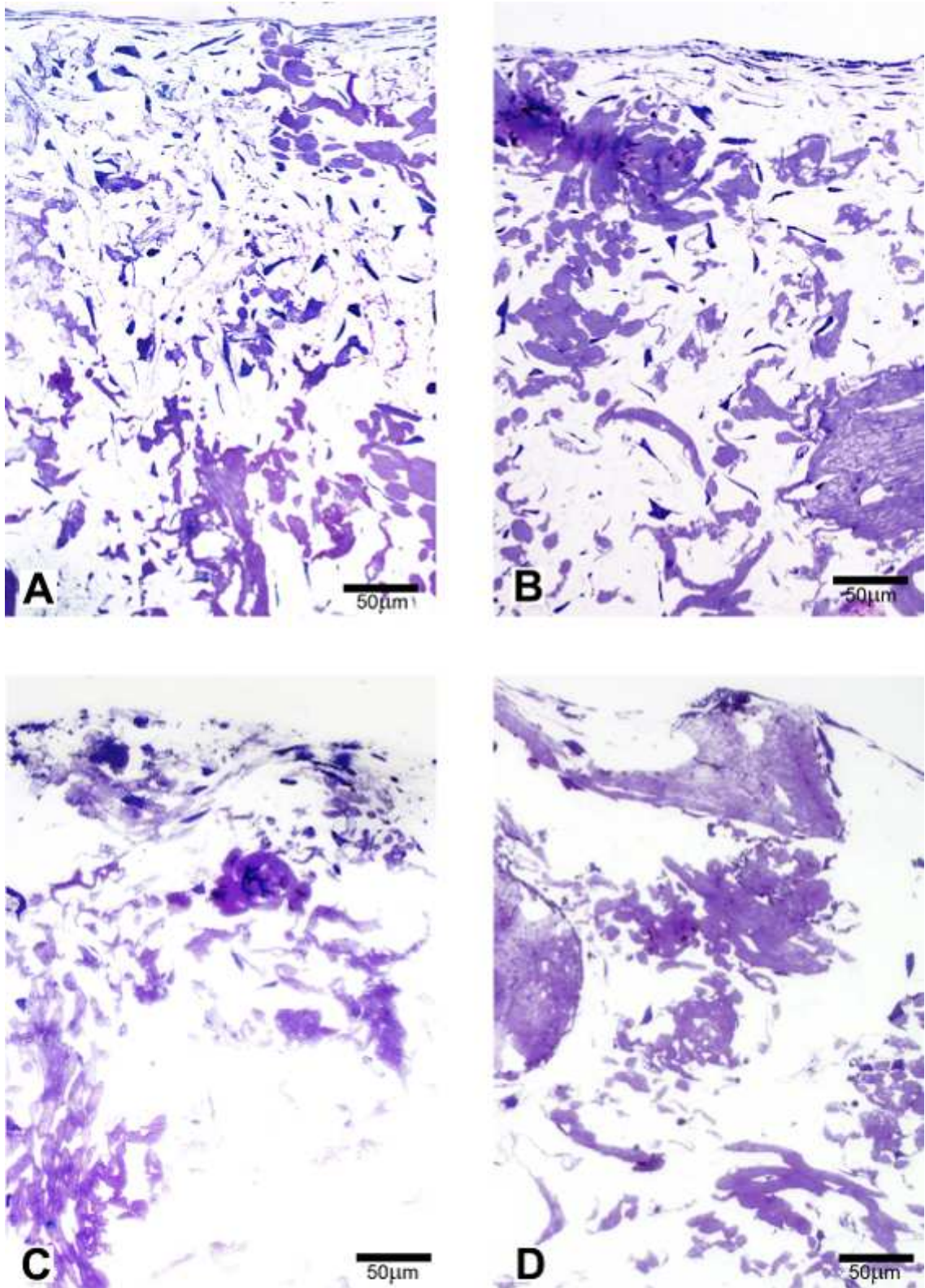


Figura 11- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 56 dias e corada com Azul de Toluidina e Fuccina. a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF- β 1.

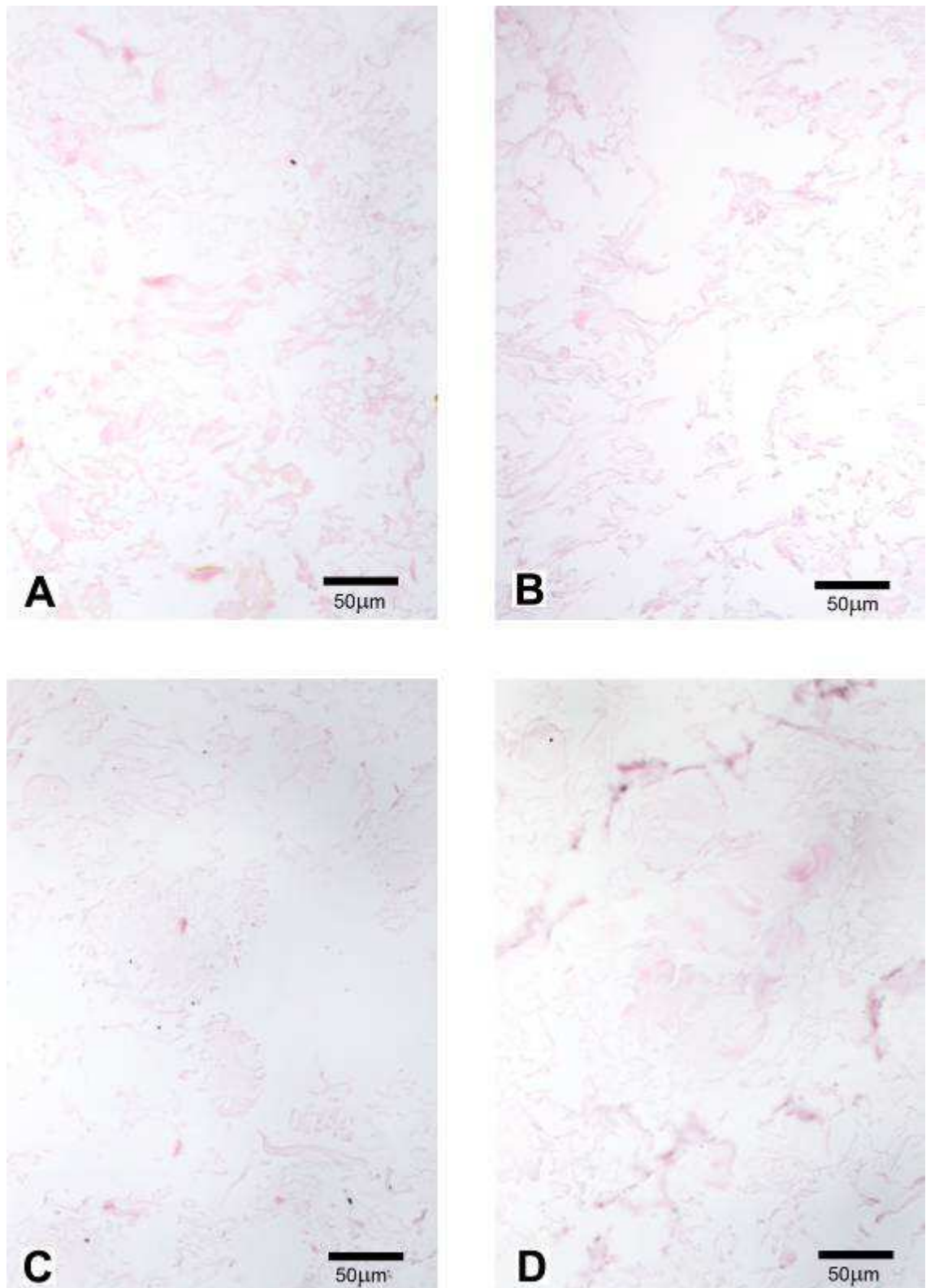


Figura 12- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após dois dias e corada pelo método de Von Kossa. a) grupo Controle b) grupo TGF-β1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF-β1.

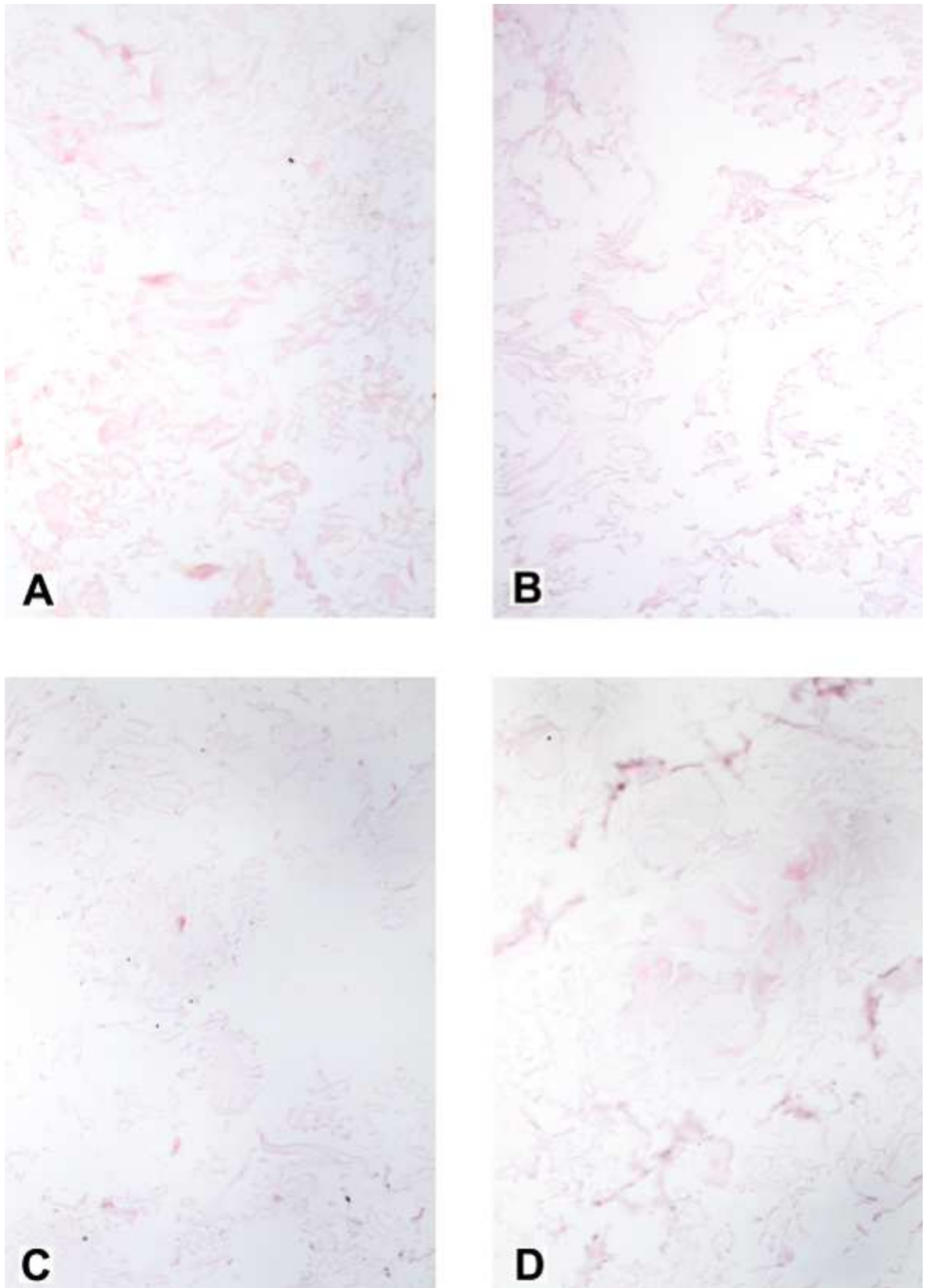


Figura 13- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após sete dias e corada pelo método de Von Kossaa. a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF- β 1.

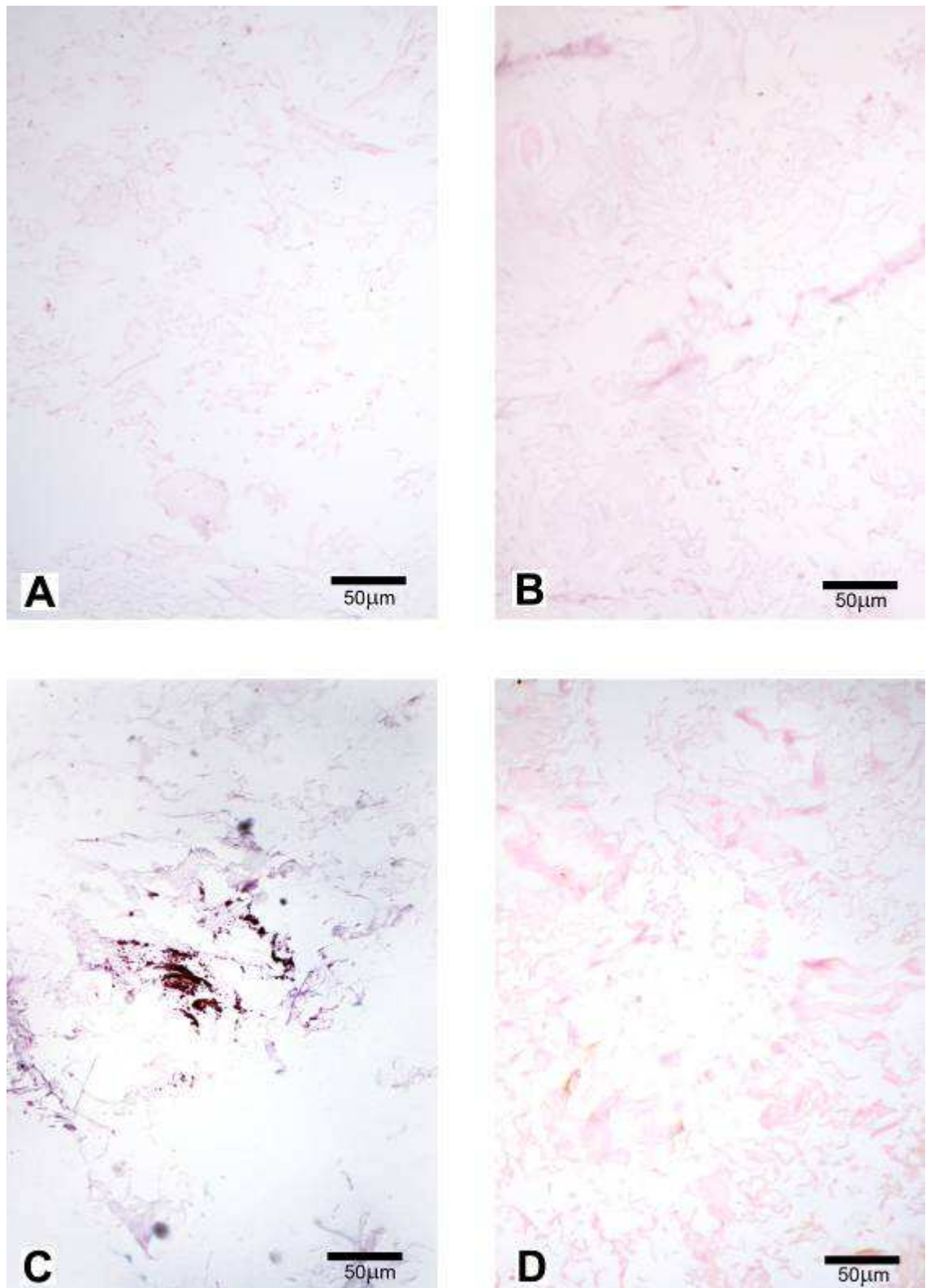


Figura 14- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 14 dias e corada pelo método de Von Kossa .a) grupo Controle b) grupo TGF-β1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF-β1.

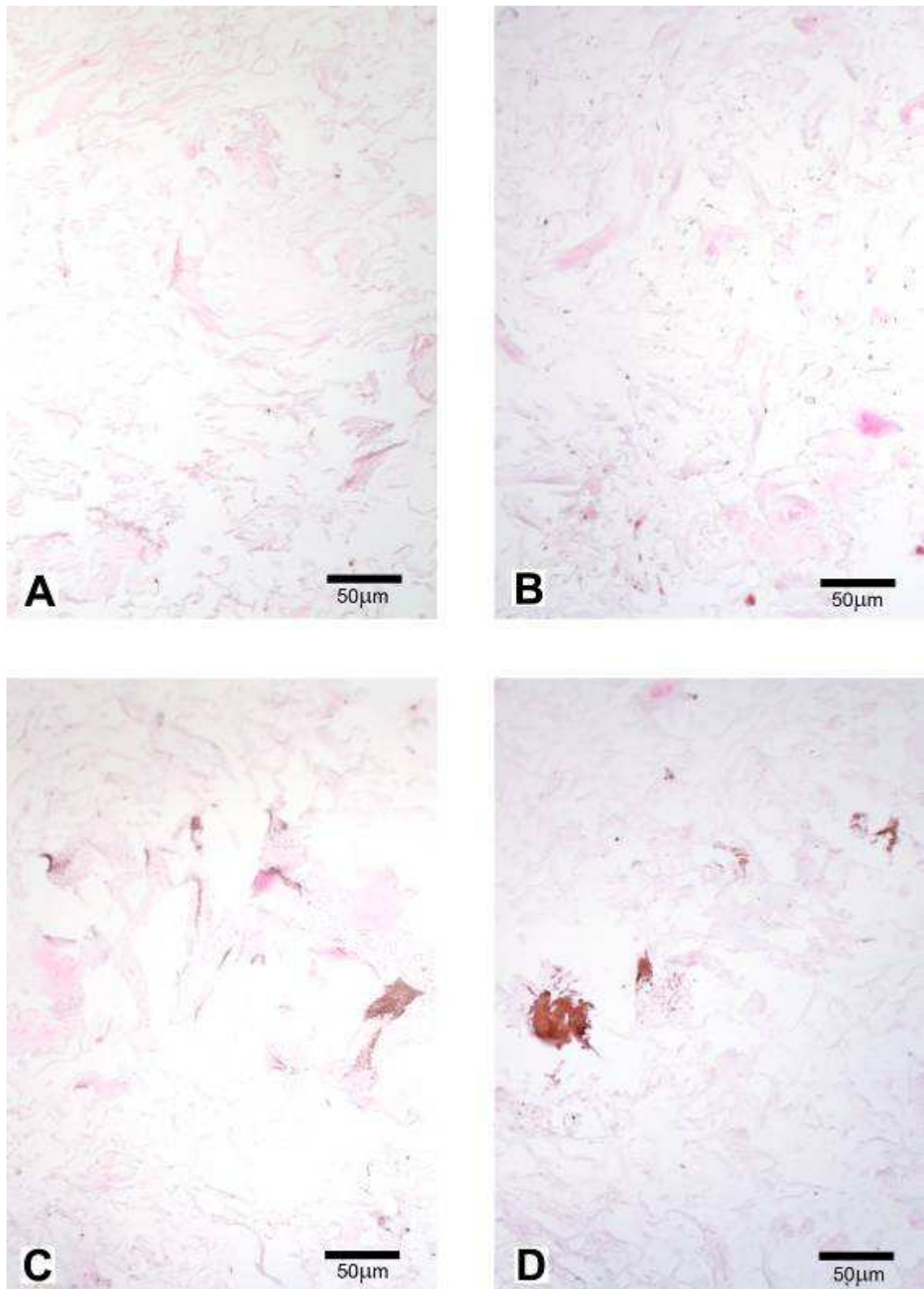


Figura 15- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 21 dias e corada pelo método de Von Kossa. a) grupo Controle b) grupo TGF-β1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF-β1.

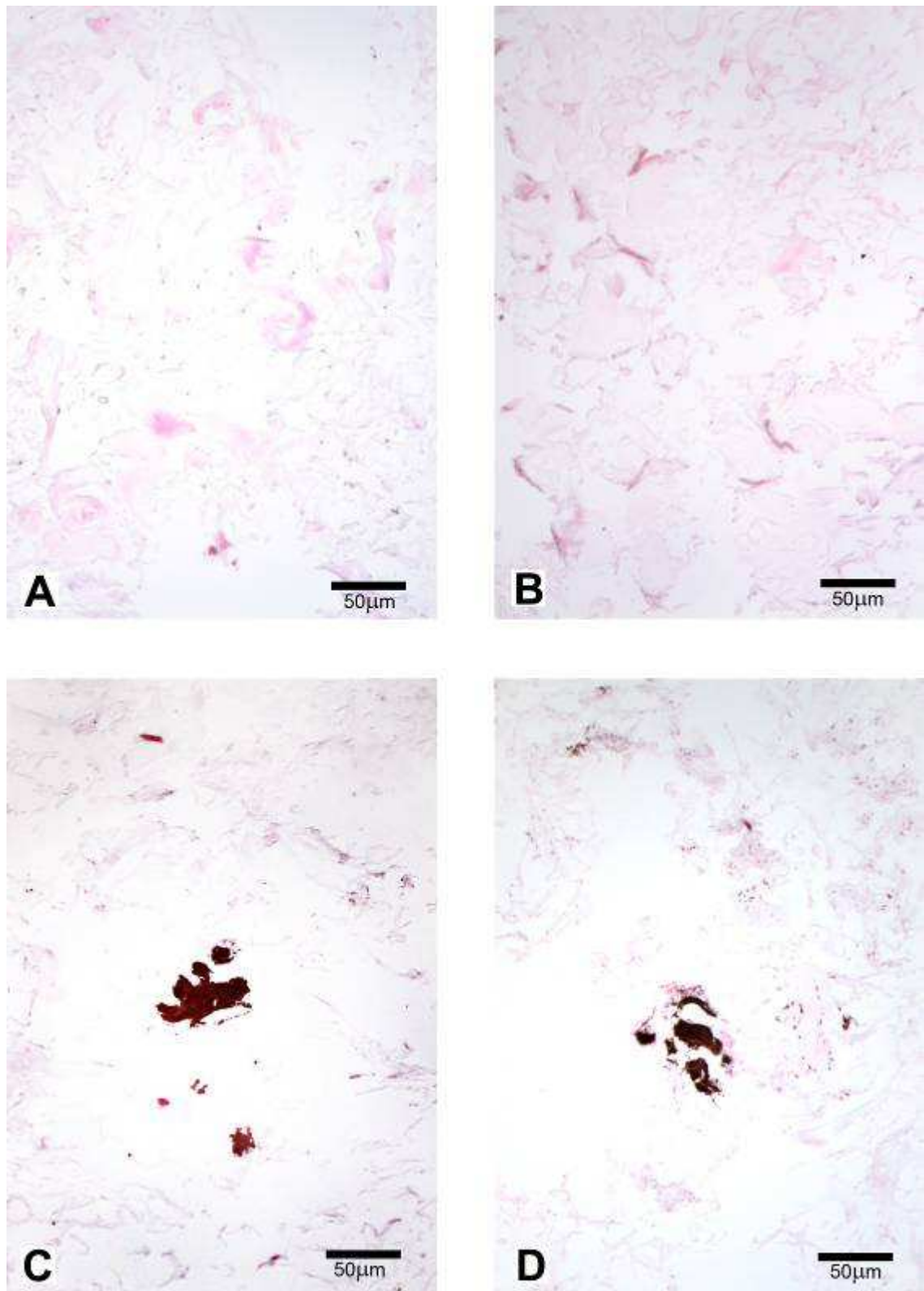


Figura 16- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 28 dias e corada pelo método de Von Kossa. a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF- β 1.

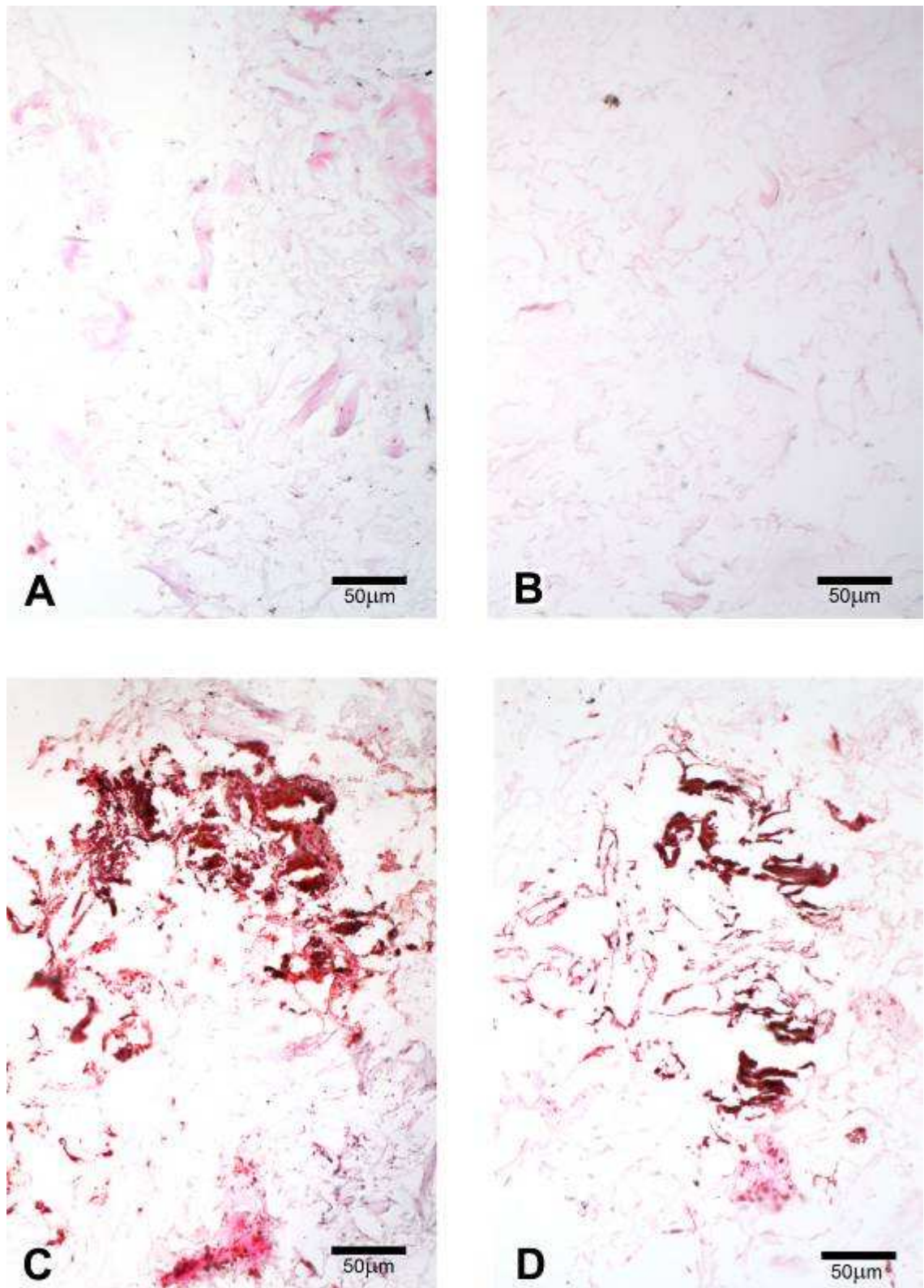


Figura 17- Aspecto microscópico da esponja de colágeno após 56 dias e corada pelo método de Von Kossa. a) grupo Controle b) grupo TGF- β 1 c) grupo Osteog. e d) grupo Osteog. TGF- β 1.

DISCUSSÃO

6. Discussão

A Engenharia Tecidual (ET) tem emergido como uma alternativa promissora para as estratégias de regeneração do tecido ósseo (LOCKLIN, OREFFO & TRIFFIT, 1998; KEMP *et al.*, 1998; WALSH *et al.*, 2001; SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002; FARHADI *et al.*, 2002; HEE *et al.*, 2006; BERNHARDT *et al.*, 2007). O desenvolvimento de tecidos esqueléticos *in vitro* e *in vivo* depende da aplicação com sucesso da utilização de células fenótipo-específicas ou fatores de crescimento bioativos integrados a matrizes ou arcabouços. Estratégias de regeneração baseadas em Engenharia Tecidual, tem mostrado eficácia na reparação de tecido ósseo demonstrando que a reparação de defeitos, cujo volume de perda foi considerado crítico pode num futuro próximo ser tratado pela combinação de células tronco mesenquimais semeadas em arcabouços tridimensionais (CHEN *et al.*, 2004; KOZHEVNIKOVA *et al.*, 2007).

Embora resultados da ET óssea com animais de experimentação tem se mostrado promissores, eles ainda permanecem inconclusivos, na questão que envolve a indução a uma resposta concreta para corrigir defeitos críticos, principalmente com grandes perdas de tecido. Além disto, os precursores osteogênicos autólogos, ainda são intrinsecamente limitados, devido ao seu complexo e custoso processo celular de regeneração e a correlação entre o aumento da idade com a progressiva perda da capacidade de mineralização. Estas limitações têm levado os pesquisadores a procurar novas fontes de células para a regeneração óssea (HEE *et al.*, 2006)

As fontes de células para restaurar a função biológica do tecido ósseo podem ser próprias ou não do tecido ósseo. Células formadoras nativas do

osso como os osteoblastos são difíceis de isolar e expandir *in vitro* (HEE *et al.*, 2006).

Por esta razão, uma fonte alternativa de células que possa funcionar como um osteoblasto é interessante. De uma maneira geral, esta linhagem celular deveria ser não imunogênica, de rápida expansão e adquirida por meio de um procedimento minimamente invasivo. Embora células da medula tenham sido utilizadas para este fim, na Engenharia Tecidual elas requerem uma cultura especializada e um procedimento de purificação que pode resultar em uma população celular menor que a desejada (HEE *et al.*, 2006). Células não osteogênicas, como os fibroblastos dérmicos, são uma particular fonte de células, porque são de fácil obtenção a partir de tecidos autólogos e também possuem uma rápida expansão *in vitro*. Mesmo com estas condições favoráveis os fibroblastos são pobremente definidos em termos moleculares (REDDI & HUGGINS, 1972; ABERCROMBIE, 1976; SMITH *et al.*, 1997; CHANG *et al.*, 2002; GRON, *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; HEE *et al.*, 2006).

Os fibroblastos são considerados mais do que uma fonte celular, podendo ser considerados como uma célula residente sentinela, como por exemplo quando são ativados por substâncias liberadas durante uma injúria tecidual ou derivados de uma infecção por microorganismos ou por fatores do ambiente, onde produzem citoquinas que iniciam o recrutamento de células tronco da medula óssea (SMITH *et al.*, 1997). Fibroblastos dérmicos humanos possuem capacidade de diferenciação osteogênica (HEE *et al.*, 2006), este fato já também foi descrito por HIRATA & YAMAGUCHI (2007) os quais atribuíram ao meio de cultura e sua suplementação, o desenvolvimento da fenotipagem osteoblástica.

Posteriormente, REDDI & HUGGINS(1972), demonstraram que fibroblastos tem um potencial para diferenciação em células osteoprogenitoras quando expostas a uma matriz contendo osso descalcificado. Mesmo, quando se propõe um grupo determinado de células, como os fibroblastos, pode haver diferenças entre estas mesmas células, originárias de diferentes locais. Especialmente os fibroblastos dérmicos e gengivais possuem a capacidade de expressar marcadores da atividade osteoblástica (REDDI & HUGGINS, 1972, TAWEBON *et al.*, 2002). Muitos fatores têm demonstrado que podem influenciar a diferenciação de células de linhagem não osteogênica, na produção de marcadores de atividade osteoblástica *in vitro*, como a dexametasona, β - glicerofosfato e o ácido ascórbico (WALSHE *et al.*,2001).

A formação óssea é suportada, por uma série de fatores de crescimento, dentre eles: fator de crescimento de fibroblastos (FGF), proteínas morfogenéticas do osso (BMP), fator de crescimento transformante beta-1(TGF- β 1) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Estes fatores têm sido utilizados na engenharia tecidual do osso, isolada ou conjuntamente para melhorar as condições de reparação óssea ou na utilização de arcabouços com células previamente semeadas (ABERCROMBIE,1975). Uma das qualidades expressas pelos fibroblastos é a de memória de posição (CHANG *et al.*,2002), ou seja, células de diferentes sítios respondem de maneira diferente a estímulos semelhantes, isto de alguma maneira, pode restringir a proliferação e a sobrevivência em uma posição ectópica (CHANG *et al.*,2002).

Duas grandes vantagens da cultura de células são o controle do ambiente físico-químico como por exemplo o pH, temperatura, pressão osmótica, O₂ e CO₂, como também o controle das condições fisiológicas.

Como as amostras de tecido são invariavelmente heterogêneas, a replicação, mesmo de um único fragmento tecidual, resulta em diferentes tipos de células. Conforme as células são misturadas randomicamente em cada transferência, após as primeiras passagens, as linhagens celulares cultivadas assumem uma constituição uniforme.

As condições de cultura também exercem uma pressão seletiva, resultando em uma cultura homogênea do tipo celular mais vigoroso. Assim, cada subcultura realizada será idêntica à anterior, e a característica da linhagem pode ser perpetuada por várias gerações ou congelada em nitrogênio líquido por períodos indeterminados. As culturas também podem ser expostas diretamente aos reagentes em concentrações baixas e definidas por causa do acesso direto à célula, além de evitar questões morais, legais e éticas da experimentação em animais (FRESHNEY, 1994).

Para induzir a situação ideal de proliferação de fibroblastos dérmicos cultivados, tem se utilizado uma suplementação de 20% de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura (GREEN & GOLBERG, 1963; GREEN & GOLBERG, 1964). No presente estudo, foi utilizada a suplementação no meio de cultura de soro fetal bovino (SFB) a 10%, apesar de que para alguns autores os fatores de crescimento do soro poderiam induzir o fenótipo fibroblástico, bem como não ser condutivo para a diferenciação osteoblástica à partir de precursores dérmicos (HEE *et al.*, 2006).

A utilização de um meio de cultura com a suplementação com SFB a 10% na cultura com finalidade de diferenciação osteogênica, foi proposta para preservar a sua proliferação, devido ao longo período de cultivo (GRON *et al.*, 2002). Em seus estudos ANDRADES *et al.* (1999) relataram que ao utilizar o meio de cultura com suplementação de 10% de soro fetal

bovino na presença de rhTGF- β 1-F2, resulta na amplificação da população celular.

Neste estudo foi utilizada a técnica de explante para o cultivo de fibroblasto descrita por GREEN & GOLBERG (1963). Apenas células entre a quarta e nona passagens foram utilizadas em todos os experimentos. Isto se deve a dois fatores principais: 1) a estabilização das células em cultura, assim como a perda da influência dos fatores séricos do indivíduo doador sobre as mesmas, que se dá geralmente após a terceira passagem (CAMPANER *et al.*,2006; KEIRA *et al.*,2004); e 2) no caso dos fibroblastos, existe uma perda das características celulares que havia *in vivo* após a 12^o passagem, apesar de se manterem viáveis até a 50^o passagem (FRESHNEY, 1994).

Os experimentos foram iniciados quando a cultura atingia uma confluência de 80%. Isto porque durante a fase de proliferação celular a produção de MEC é muito baixa, o gasto celular estaria voltado para a replicação, e a produção da MEC se torna predominante quando as células estão próximas da confluência nas garrafas ou placas de cultura (GREEN & GOLDBERG, 1963; GREEN & GOLDBERG, 1964).

Os experimentos com cada grupo foram realizados em triplicatas, número que foi adequado para que a diferença estatística fosse detectada. Na triplicata temos a mesma carga genética, pois as células são da mesma linhagem, reduzindo a necessidade de uma análise estatística de variância (FRESHNEY, 1994). Nos nossos experimentos o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado por estarem sendo avaliados dados não-paramétricos, onde não se pôde garantir a distribuição gaussiana dos mesmos. O grupo controle era composto por células cultivadas em meio padrão para fibroblastos, e os

grupos de estudo, constituídos por meio padrão suplementado por fatores indutores osteogênicos com ou sem TGF- β 1.

A diferenciação celular em uma linhagem osteogênica, pode ser identificada por alterações na produção de fatores de crescimento, molecular e bioquímico, como os marcadores de fenótipo e de células progenitoras (KRAMPERA *et al.*,2006; KOLF *et al.* 2007). Muitos marcadores da osteogênese tem sido identificados como o colágeno tipo 1(COL1), fosfatase alcalina (FAL), osteocalcina (OC), osteonectina (ON) e a osteopontina (OP). Em nosso estudo foram estudados como marcadores da atividade osteoblástica a fosfatase alcalina (FAL) e a osteocalcina (OC) por representarem a atividade osteoblástica (PHILIPS *et al.*,2005; ISSA *et al.*,2006;; PHILIPS *et al.*,2006).

A suplementação do meio de cultura com fatores bioquímicos para diferenciação osteogênica foi realizada, no presente estudo, utilizando-se dexametasona (DEX), ácido ascórbico (AA) e beta-glicerofosfato (β -GF). A DEX é um glicocorticóide, que por sua vez pertence à classe dos hormônios esteróides secretados pelo córtex adrenal que dentre outras funções desempenha ações anti-inflamatórias de regulação das células T, crescimento e diferenciação celular (REYES *et al.*,2006). Também inibe a indução da síntese de óxido nítrico. A dexametasona é definida como um derivado sintético das glicoproteínas com um complexo efeito estimulante e inibitório sobre o sistema esquelético.

Estudos *in vitro* demonstraram que a DEX estimula a osteogênese por meio de estimulação da proliferação de células. Entretanto, um excesso de DEX *in vivo*, têm sido relacionado com uma queda na taxa de formação e de reabsorção óssea (PHILLIPS *et al.*, 2005). O efeito da DEX sobre o

tecido ósseo depende da espécie estudada, estágio de desenvolvimento, bem como do seu tempo de exposição e concentração utilizada. Pode-se observar um comportamento antagônico da DEX, em relação a diferenciação osteoblástica de células pertencentes ou não à linhagens osteoblásticas, dependentes da sua concentração no meio de cultura (WALSH *et al.*,2001). A concentração crítica tem sido colocada como 10 nM, a qual se aproxima da quantidade fisiológica de DEX, é possível verificar efeitos sobre a fosfatase alcalina e alguns transcritores genéticos . Nas concentrações supra-fisiológicas como a de 100nM (REYS *et al.*,2006), os efeitos da DEX sobre a diferenciação celular foram aumentados, mas ocorrem também uma progressiva diminuição da expressão de marcadores e do número de células. Um importante componente da ação da DEX sobre células de linhagem osteoblástica é a sua habilidade de influenciar a produção ou bio-disponibilidade de uma variedade de elementos ligados à fisiologia óssea no micro-ambiente ósseo (REYS *et al.*,2006).

Neste estudo foi utilizada a concentração de 10nM de dexametasona, coincidente com os estudos de COELHO& FERNANDES (1999a); WALSH *et al.*(2001) ;BELOTI & ROSA (2005); PHIPLIPS *et al.* (2006) e HEE *et al.*(2006) REYES *et al.*(2006).

O ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, desempenha um importante papel na ligação das fibrilas colágenas. A formação das ligações hidrógenas inter-cadeias entre as fibrilas, permite a interrelação e estabilidade das fibrilas. A vitamina C atua como um co-fator para a enzima prolidoxilase que transfere um grupo hidroxila para a prolina e lisina residuais na cadeia de pro-colágeno. As quantidades médias

do ácido ascórbico na suplementação do meio de cultura na diferenciação osteogênica são de 100 e 50µg/ml.

O ácido ascórbico pode ser entendido como sendo um co-fator enzimático e antioxidante que estimula a transcrição, translação e pós-translação do colágeno em células do tecido conjuntivo. Em cultura de células derivadas do osso, o ácido ascórbico estimula a diferenciação osteoblástica, síntese e deposição de colágeno, bem como a mineralização (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002). Em seus estudos OWEN, ARONOW, SHALHOUB (1990), realizaram o cultivo de células pré-osteoblásticas com várias concentrações de ácido ascórbico, mostrando que existe uma relação dose-dependente com síntese de colágeno e que isto resulta no acúmulo de MEC, a qual por sua vez está ligada a atividade da FAL, os autores destes estudos concluíram que a quantidade de 50µg/ml de ácido ascórbico, produziu os melhores resultados *in vitro*.

No presente estudo, trabalhou-se com a suplementação do meio de cultura osteogênico com a quantidade de 50µg/ml de ácido ascórbico, de acordo com os trabalhos de COELHO & FERNANDES (1999), PHILLIPS *et al.*(2006) e BERNHARDT *et al.*(2007).

O β-glicerofosfato (β-GF) tem sido relatado como uma fonte de fosfato para a mineralização da matriz extra-celular. Alguns estudos, como o de ZHOU *et al.* (2005), demonstraram que a atividade de FAL é necessária para a mediação da mineralização para que o β-GF libere o fosfato para o meio extra celular. JAISWAL *et al.*(1997) avaliaram a diferenciação de células tronco da medula óssea, sob condições de diferentes concentrações de DEX, AA e β-GF no meio de cultura controle contendo 10% de soro fetal bovino. As melhores condições para a

diferenciação osteogênica ocorreram com a utilização de 10mM de β -GF, onde houve maior nível de mineralização da matriz, acompanhado de uma alta expressão de FAL e osteocalcina, quando comparada com as demais concentrações (PHILLIPS *et al.*,2005).

O meio de cultura com a presença simultânea de ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona forma o que denominamos de meio de cultura osteogênico (VLASSELAER *et al.*,1994).

A fosfatase alcalina é um dos marcadores que mais cedo se detectam na formação óssea. CAPLAN & PECHAK (2001) demonstraram a atividade da FAL, na formação do osteóide e cartilagem entre 5 a 6 dias no desenvolvimento da tíbias em galinhas, o que segundo os autores seria equivalente a uma tíbia humana de 42 a 50 dias no desenvolvimento embrionário. A fosfatase alcalina contida no plasma humano é fisiologicamente a somatória de várias isoenzimas que provém do osso, do fígado, do intestino e da placenta, durante a gravidez. Como a fosfatase alcalina é definida como um marcador da atividade osteoblástica o surgimento desta isoenzima coincide com a formação óssea (NASCIMENTO *et al.*,2007). A fosfatase alcalina é um parâmetro laboratorial largamente utilizado em ortopedia, embora o seu significado clínico ainda não esteja completamente entendido (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 200).

No presente estudo, no grupo CONTROLE e no grupo TGF- β 1 os valores médios encontrados da atividade da fosfatase alcalina foram próximo de zero em todos os pontos de avaliação do estudo, demonstrando que a atividade desta enzima não ocorreu em fibroblastos cultivados em meio de cultura sem suplementação, e também quando existe apenas a

presença do fator de crescimento. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de HEE *et al.* (2005) e JANSSENS *et al.* (2005) que apontam o fato de que é necessário a suplementação de fatores osteoindutores para que haja a diferenciação celular osteoblástica. Nos grupos OSTEOG. e OSTEOG. TGF- β 1 os valores médios da atividade da fosfatase alcalina se mostraram estatisticamente maiores em relação ao grupo controle em todos os pontos do estudo, apresentando um aumento dos valores em relação ao tempo de cultura do segundo ao vigésimo primeiro dias com uma subsequente queda no vigésimo oitavo dias, obtendo valores próximos de zero no quinquagésimo sexto dias.

Estes resultados demonstraram que a suplementação do meio de cultura com os fatores osteoindutores, levou a um aumento da atividade da fosfatase alcalina, indicando uma atividade osteoblástica. Quando comparamos os valores do grupo OSTEOG. com os valores do grupo OSTEG.TGF- β 1, verificou-se que com a adição de TGF- β 1 os valores da atividade da fosfatase alcalina foram estatisticamente maiores, isto pode demonstrar que na presença deste fator de crescimento houve uma maior atividade osteoblástica. Em relação ao tempo de cultura ambos os grupos demonstraram um comportamento semelhante, atingindo seu pico máximo aos vinte e um dias de cultura, com uma subsequente diminuição. Os estudos de ZHOU *et al.* (2005), que utilizaram células osteogênicas, obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que atividade da fosfatase alcalina se inicia nas primeiras horas do cultivos e atinge seu pico máximo entre 14 e 21 dias. Esta diminuição após 21 dias de cultivo, pode ser explicada pela não resposta dos fibroblastos frente ao estímulo para diferenciação.

A osteocalcina é uma proteína não colágena mais abundante no osso e na dentina, embora a sua função específica não seja conhecida, sabemos que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. A osteocalcina possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio e isto pode ser importante no processo de mineralização óssea (THAWEBOON *et al.*,2002). No grupo CONTROLE e no grupo TGF- β 1 os valores médios encontrados da atividade da fosfatase alcalina foram próximos de zero em todos os pontos de avaliação do estudo, demonstrando que a atividade desta enzima não ocorre em fibroblastos cultivados em um meio de cultura sem suplementação osteogênica, e também quando existiu apenas a presença do fator de crescimento transformante, resultados semelhantes aos encontrados para a atividade da FAL.

Nos grupos OSTEOG. e OSTEOG.TGF- β 1 os valores médios da quantidade de osteocalcina se mostraram estatisticamente maiores em relação ao grupo controle em todos os pontos do estudo, apresentando um aumento dos valores em relação ao tempo de cultura do segundo ao vigésimo-primeiro dias com uma subsequente queda no vigésimo oitavo dias, obtendo valores próximos de zero no quinquagésimo sexto dias. Estes resultados demonstram que a suplementação do meio com os fatores osteoindutores, levou a um aumento da quantidade de calcina, indicando uma atividade osteoblástica. Quando comparamos os valores médios da quantidade de osteocalcina do grupo OSTEOG. com os valores do grupo OSTEOG.TGF- β 1, verificou-se que com a adição de TGF- β 1 os valores foram estatisticamente maiores, isto pode demonstrar que na presença deste fator de crescimento houve uma maior atividade osteoblástica. Em relação

ao tempo de cultura, ambos os grupos demonstraram um comportamento semelhante, atingindo seu pico máximo aos vinte e um dias de cultura, com uma subsequente diminuição. Os estudos que avaliaram a quantidade de osteocalcina obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que a atividade se inicia nas primeiras horas do cultivo e atinge seu pico máximo entre 14 e 21 dias (COELHO & FERNANDES, 1999b, HEE *et al.*, 2006) .

Na comparação dos resultados deste estudo, podemos observar que tanto a atividade da FAL como a quantidade de OC foram estatisticamente maiores nos grupos OSTEOG. e OSTEOG.TGF- β 1 em todos os pontos de avaliação do estudo, o que está de acordo com os estudos de ZHOU *et al.* (2005). Destes resultados pode-se notar que na presença de fatores osteoindutores os fibroblastos dérmicos, de uma maneira progressiva do segundo até o vigésimo primeiro dias da cultura exibiram valores crescentes tanto de FAL como de OC e do vigésimo primeiro dia até o quinquagésimo sexto dia houve um decréscimo da atividade e quantidade destes marcadores.

Tanto a atividade da FAL como da OC, foi também relatada como sendo progressiva até o vigésimo primeiro dia e por conseguinte havendo uma diminuição dos valores a partir desta data em cultura por BELLOWS *et al.* (1993), MATOS & SANT'ANA, 1996; HORNER *et al.*(1998) e COELHO & FERNANDES (1999a,b), sendo este aumento correspondente a um indicativo da diferenciação celular, o decréscimo destes valores parecem estar ligados ao fato de que o β -GF sofre hidrólise tempo dependente no meio de cultura.

Os mamíferos expressam três isoformas de TGF- β denominados TGF- β 1, 2 e 3. O TGF- β 1 é a isoforma mais abundante em todos os

tecidos. Mais de 85% do TGF- β nos fluidos das feridas humanas é do tipo 1, embora no fluido de feridas de fetos do segundo trimestre, que não formam cicatriz, o tipo 2 é a isoforma predominante (ROBERTS & SPORN, 1996; O'KANE & FERGUSON, 1997; LAWRENCE, 2001). A expressão do TGF- β 1 é seletivamente induzida em resposta a vários estímulos que se seguem após o trauma, isquemia ou anóxia, na carcinogênese e fibronogênese. Em contraste, a expressão dos TGF- β 2 e 3 é regulada primariamente em resposta a sinais hormonais de desenvolvimento (ROBERTS & SPORN, 1996; GAHARY *et al.*,2002).

O TGF- β 1 é um dos mais abundantes mitogênicos, na matriz extracelular humana. Ele tem sido localizado em centros de diferenciação óssea e cartilaginosa. Tem sido reportado que o TGF- β 1 esta relacionado com os estágios precoces da diferenciação osteoblástica, mas está inibido nos estágios tardios da diferenciação osteoblástica. Acredita-se que o TGF- β seja ativado pelo microambiente ácido criado pelos osteoclastos, quando a reabsorção óssea aumenta, isto resulta no aumento da liberação de TGF- β . REDDI & HEGGINS (1972) determinaram que na matriz óssea em pó havia uma intensa quimiotaxia para fibroblastos iniciando a fase transformante, a qual acontecia do centro para a periferia. Um outro fator relacionado com a influência da transcrição gênica do TGF- β 1, foi a presença de interleucina-10 (IL-10), a qual demonstrou reduzir o RNAm do TGF- β 1 em aproximadamente 40% (CLARK *et al.*,1997).

Em relação a situação biologicamente latente ou ativa do TGF- β 1 no sobrenadante da cultura osteoblástica ainda não está esclarecido se o TGF- β 1 é sintetizado na forma ativa ou se o TGF- β 1 latente é ativado após a sua secreção (CENTRELLA, 1994).

Todas as três isoformas do TGF- β são detectadas no osso, mas o TGF- β 1 é o mais abundante. Informações derivadas de estudos *in vitro*, com evidências do papel do TGF- β 1 nos diversos estágios do desenvolvimento ósseo (JANSSENS *et al.*,2005). Acredita-se que o TGF- β 1 aumenta a formação óssea *in vitro* principalmente recrutando osteoblastos progenitores e estimulando sua proliferação, bem como, promovendo os estágios iniciais de diferenciação e mineralização. O TGF- β 1 afeta a migração e a fusão dos precursores dos osteoclastos e inibe a atividade de osteoclastos maduros, sendo liberado durante a reabsorção óssea (LOCKLIN, OREFFO &TRIFFITT, 1998). Os estágios mais tardios da diferenciação e mineralização são regulados por outros fatores de crescimento como as BMPs. A apoptose dos osteoblastos foi bloqueada pela presença de TGF- β 1. Segundo KATAGIRI *et al.* (1994) em contraste com as BMPs o TGF- β 1 não é capaz de induzir a osteogênese em células mesenquimais pluripotentes, embora ele possa inibir a diferenciação em células miogênicas.

Muitas variáveis estão presentes na avaliação do papel do TGF- β 1 na diferenciação osteogênica, tais como a densidade celular, concentração do soro e estágio de diferenciação celular. Em cultura de células a concentração de TGF- β 1 foi encontrada na faixa de 0,15 a 15ng/ml. Em concentrações mais baixas próximas de 0,15ng/ml, não se observou aumento de marcadores ósseos e densidade celular. Em níveis mais altos a concentração de TGF- β 1 pode-se observar uma maior estimulação da proliferação de osteoblastos (JANSSENS *et al.*,2005). Existe uma indicação de que a adição de TGF- β *in vitro* estimula a produção do colágeno tipo I, da osteonectina, da síntese de osteopontina e da fosfatase

alcalina, bem como a replicação de células osteoprogenitoras (KIM & NIYIBIZI, 2001).

Neste estudo, a suplementação do meio de cultura do grupo CONTROLE e OSTEOPG. foi realizada com TGF- β 1 recombinante humano (Sigma-Aldrich), na concentração de 10ng/ml, sendo esta mesma concentração utilizada por HORNER *et al.*(1998), MAEDA *et al.* (2004).

No presente estudo, a atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina foram avaliadas nos seguintes pontos de caracterização da amostra: segundo, sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro, vigésimo oitavo e quinquagésimo sexto dias de cultura. Estes pontos de caracterização foram escolhidos para que se pudesse obter uma curva de atividade abrangente com uma observação ampla da distribuição dos valores em relação ao tempo.

Em relação ao tempo máximo de cultura, os estudos variaram muito os pontos de avaliação, alguns autores como ANDRADES *et al.* (1999) cultivando células da medula óssea foram até o vigésimo primeiro dia, COELHO & FERNADES (1999a) cultivaram as mesmas células até o quadragésimo segundo dia, COELHO & FERNANDES(1999b) conduziram seu estudo de células da medula óssea até o trigésimo quinto dia. Considerando a cultura de fibroblastos dérmicos os estudos de HEE *et al.*(2006) levaram a sua cultura até o vigésimo primeiro dia. A escolha dos pontos de avaliação dos estudos que envolvem a diferenciação osteoblástica, parece estar ligada ao fato de que os marcadores da atividade osteoblástica, no caso deste estudo, a fosfatase alcalina e a osteocalcina

não possuem ainda um pico de atividade definida, pois isto depende do tipo celular, do meio de cultura e do objetivo do estudo.

No entendimento da Engenharia Tecidual a utilização de um arcabouço para servir de apoio ou ambiente para a proliferação celular, é especialmente interessante quando o objetivo é a transplantação celular (SUMITA *et al.*, 2006), estes arcabouços podem ser confeccionados por biomateriais naturais ou sintéticos, sendo que os naturais encontram no colágeno o seu principal representante (VERNON *et al.*, 2005). A opção por carreador para as células tridimensional, como a esponja de colágeno, permitiu a observação da interação das células com a esponja de colágeno, que em todos os grupos foram semeadas na região central da superfície superior da esponja.

O arcabouço utilizado neste estudo, foi uma esponja de colágeno hemofílica utilizada para preenchimento de áreas com sangramento, desta maneira já se sabia de antemão que o material não traria nenhum viés para a sobrevivência das células, e tampouco reação antigênicas. Por se tratar de um material pré-fabricado, sem a intenção de servir de arcabouço para engenharia tecidual, o qual deve possuir características especiais (GOLDSTEIN *et al.*, 2001), a sua estrutura interna não obedecia a um arranjo estrutural padronizado, como a esponja desenvolvida por CHEN *et al.* (2004), a qual era constituída por uma estrutura interna pré-determinada permitir assim a adesão e proliferação celular, mas no entanto permitiria o estudo da capacidade das células de migrar ou não para o seu interior, e se a suplementação do meio interferiria neste processo.

A esponja de colágeno apresentou uma perda na sua rigidez durante o período de cultivo, devido ao fato da mesma ficar imersa no meio de

cultura, então optou-se pela inclusão das esponjas, após a sua fixação para avaliação histológica, em agar, antes da sua inclusão em resina, para que pudéssemos identificar as superfícies com mais facilidade, bem como, manter a sua estrutura mais rígida para o corte no micrótomo.

A inclusão em resina permite a obtenção de corte finos e semi-finos, propiciando uma visualização mais clara da relação célula-esponja. Os cortes realizados foram de $0,5\mu\text{m}$ de espessura, com posterior coloração com azul de toluidina e fuccina. Esta coloração permitiu que as células fossem marcadas em azul e a esponja em vermelho. A observação dos cortes histológicos nos pontos de avaliação permitiu observar um comportamento similar em todos os grupos durante o período de cultivo, as células permaneceram na superfície da esponja na avaliação de dois dias de cultura e a partir do sétimo dia, observou-se uma penetração das células para o interior da esponja.

Uma outra avaliação, no caso de se utilizar a esponja de colágeno, poderia ser a verificação de eventuais áreas de mineralização da esponja, que pudessem ter ocorrido, devido ao fato das células terem expressado marcadores da atividade osteoblástica. Utilizamos uma coloração à base de nitrato de prata que pela afinidade deste material com o cálcio, marca com mais intensidade as áreas de depósitos mineralizados de cálcio fosfato na esponja de colágeno. A avaliação foi realizada baseando-se numa verificação visual, que permitiu identificar, se nas lâminas obtidas das esponjas de colágeno existiam ou não depósitos mineralizados que neste caso, apresentaram-se como áreas de uma coloração marrom escura evidente. Para as lâminas que não apresentaram nenhuma área de mineralização utilizamos o símbolo (-), para as lâminas que apresentaram pelo menos uma área evidente de mineralização utilizamos o símbolo (+).

Esta escala foi utilizada, pela dificuldade em se estabelecer uma contagem realista das áreas mineralizadas, quando se utiliza um arcabouço tridimensional, como a esponja de colágeno. Alguns autores como (COELHO & FERNANDES, 1999a,b) avaliaram a intensidade das áreas de depósitos mineralizados, mas no entanto, os autores realizaram seus estudos em garrafas de cultura, ou seja utilizaram uma cultura em monocamada, facilitando o cálculo da percentagem da superfície mineralizada da garrafa em relação a superfície não mineralizadas.

Nos grupos CONTROLE e TGF- β 1 a escala foi negativa, indicando que não havia nenhuma área de depósito mineralizado nas lâminas avaliadas. Nos grupos OSTEOP. e OSTEOP.TGF- β 1, verificou-se que no tempo de dois até o sétimo dia de cultivo a escala foi negativa, mas no décimo quarto dia até o quinquagésimo sexto dia observou-se a presença de áreas mineralizadas na esponja de colágeno. Embora não tenha sido o objeto principal deste estudo, observou-se também um aumento da intensidade da coloração das áreas de depósito mineralizado, com a evolução do tempo de cultivo, o que pode indicar uma relação direta do grau de mineralização da esponja com a elevação dos níveis de atividade da FAL e quantidade de OC, que nestes dois grupos foi também crescente até o vigésimo primeiro dia, com subsequente diminuição até o final do experimento.

Os resultados deste estudo, demonstraram que células de linhagem não osteogênica, como os fibroblastos dérmicos humanos podem responder com diferenciação frente a estímulos do meio extra celular contendo ou não TGF- β 1. No entanto nenhum resultado obtido, permitiu inferir se os níveis encontrados de atividade da FAL, da quantidade de OC ou das características dos depósitos mineralizados na esponja de colágeno, seriam

suficientes para determinar se fibroblastos dérmicos humanos poderiam ser designados como uma fonte alternativa de células para a engenharia tecidual do osso.

Como perspectivas deste estudo temos a utilização do TGF- β 1 em células de linhagem osteogênica cultivados em meio osteogênico, da utilização de outros fatores de crescimento na diferenciação de fibroblastos dérmicos, na avaliação do sistema RANK-RANKL nas fibroblastos diferenciados diferenciadas por meio de PCR-RT, a utilização das esponjas de colágenos carregadas com as células diferenciadas em modelos animais

CONCLUSÃO

7. Conclusão

O TGF- β 1 no meio osteogênico, na cultura de fibroblastos dérmicos humanos em esponja de colágeno, aumentou a atividade da fosfatase alcalina e a quantidade de osteocalcina, não alterando a interação célula/esponja e a presença de depósitos mineralizados de cálcio fosfato na estrutura da esponja de colágeno

REFERÊNCIAS

8. Referências

Abercrombie M. Fibroblasts. *J Clin Path.* 1972;31:1-6

Andrades JA, Bo HAN, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimmi M. A recombinant human TGF- β 1 fusion protein with collagen-binding Domain promotes migration, growth and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Experimental Cell Res.* 1999;250:485-98

Beloti MM & Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J.* 2005;16(2):156-61

Bellows CG, Heersch JNM, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Min* 1992;17:15-29

Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, Pompe W, Gelissk M. Mineralised collagen-an artificial, extracellular bone matrix-improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Mater Sci.* 2007;24:134-45

Campaner AB, Ferreira LM, Grafnani A, Cusick JL, Morgan JR. Up-regulation of TGF- β 1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol.* 2006;5:1168-76

Carver SE, Heath CA. Semi-continuous perfusion system for delivering intermittent physiological pressure to regenerating cartilage *Tissue Eng.* 1999 Feb;5(1):1-11.

- Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor beta gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994;1:15-24
- Chang HY, Dudoit S, Bondre C, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*. 2002;99(20):12877-82
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. A hybrid network of synthetic polymers mesh and collagen sponge. *Chem Commun*. 2000;3:1505-6
- Chen G, Sato O T, Oohgushi H, Tateishi T, Tanaka J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials*. 2004;26:2559-66
- Clark RAF, McCoy Y GA, Folkvord JM, McPherson JM. TGF- β 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol*. 1997;170:69-80.
- Coelho MJ & Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation *Biomaterials*. 1999a;21:1087-1094
- Coelho MJ & Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation *Biomaterials*. 1999b;21:1095-1102

Eldad A, Burt A, Clarke JA, Gusterson B. Cultured epithelium as a skin substitute *Burns Incl Therm Inj*. 1987 Jun;13(3):173-80.

Farhadi J, Jaquery C, Barbero A, Jakob M, Schaeren S, Gerhard P. Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGF- β 1 e VEGF expression by human bone marrow stromal cells. *Plastic Reconstr. Surg*. 2005;10:1379-86

Freshney RI. The Culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature In: Freshney RI, editor. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 71-101

Gahary A, Tredged EE, Ghahary A, Bahar MA, Telasky C. Cell proliferating effect of latent transforming growth factor- β 1 is cell membrane dependent. *Wound Rep Reg*. 2002;10:328-35.

Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gutin MC, Mikos AG. Effect of function in biodegradable polymer foam sacaffolds. *Biomaterials*. 2001;22:1279-88

Green H, Goldeberg B. Kinectics of collagen synthesis by established mammalian cell lines. *Nature*. 1963;200:1097-8.

Green H, Goldberg B. Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line. *Nature*. 1964;204:347-9

Gron B, Stoltze K, Andersson A & Dabelsteen E. Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. *APMIS*. 2002;110:892-8

- Hee C, Jonikas MA, Nicoll SB. Influence of three dimensional scaffold on the expression of osteogenic markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials*. 2006;27:875-84
- Hirata K, Mizuno A, Yamaguchi A. Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 contributes to the healing of critical bone defects. *J Bone Miner Metab*. 2007;25:6-11
- Horner A, Kemp P, Summers C, Bord S, Bishop NJ, Kelsall AW. Expression and distribution of TGF- β isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*. 1998;23(2):95-102
- Issa JPM, Tiozzi R, Pitol DL, Mello ASS. TGF- β and Bone Formation. *Int J Morphol*. 2006;24(3):399-405
- Janssens K, Duke P, Janssens S & Hul WV. Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocrine Reviews*. 2005;26:743-74
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312.
- Jaworski J, Klapperich M. Fibroblast remodeling activity and three dimensional collagen-glycosaminoglycans. *Biomaterials*. 2006;27:4212-20
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127:1755-66.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos IA. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirurgica Brasileira*.

2004;19(suplem):11-6

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-56

Kim MK & Niyibizi C. Interaction of TGF- β 1 and rhBMP-2 on human bone marrow stromal cells cultured in collagen gel matrix. *YONSCI*.

2001;42(3):338-44

Kolf CM, Cho E, Tuan R. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Therapy*

2007;9:204-10

Kozhevnikova MN, Mikaelyan AS, Starostin VL. Molecular and genetic regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells. *Cell Biol*. 2008;3:223-38

Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006;39:678-

83

Langer R & Vancanti JP. *Tissue Engineering*. Science. 1993;14(260):920-6

Lawrence DA. Latent- TGF- β : An overview. *Mol Cell Bioch*.

2001;219:163-70

Locklin RM, Oreffo R, Triffitt JT. Effects of TGF- β and FGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int.* 1999;23(3):185-94

Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO Journal.* 2004;23: 552-63

Matos MA & Sant'ana FR. Identificação da isoenzima óssea de fosfatase alcalina por termoativação. *Ver Brás Ortop.* 1996;31(3):268-76

Nascimento C, Issa JPM, Oliveir RR, Siessere S, Regalo SCH. Biomaterials applied to the bone healing process. *Int J Morphol.* 2007;25(4):839-46

O'kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor β s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:63-78

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Phys.* 1990;143:420-3-

Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowics AM, Garcia AJ. Glucorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci.* 2005;19:581-91

Phillips JE, Hutmacher DW, Guldberg RE, García AJ. Mineralization capacity if Runx2/Cbfa 1-genetically engineered fibroblasts is scaffold dependent. *Biomaterials.* 2006;27:5535-45

Reddi AH & Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescents rats. PNAS. 1972;69(6):1601-5

ReyeS JM, Fermanian S, Yang F, Zhou S, Herretes S, Murphy DB, Elisseff JH & Chuck RS. Metabolic changes in mesenchymal stem cells in osteogenic medium measured by autofluorescence spectroscopy. StemCells. 2006;24:1213-17

Roberts AB, Sporn MB. Transforming Growth Factor. In: Clark R.A.F., editor. The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1996. p. 275-308.

Saraiva GL & Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea prática clínica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002;46(1):72-8

Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in Lamb model. Ann Thorac Surg. 1995 Dec;60(6 Suppl):S513-6.

Smith RS, Smith TJ, Blieden TM & Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Am J Pathology. 1997;151(2):317-22

Sumita H, Honda MJ, Ohara T, Shuhei T, Sagara H, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. Biomaterials. 2006;27:3238-48

- Taweboon S, Chunhabundit P, Surarit R, Swasdison S, Suppukpatana P. Effects of lead on the proliferation, protein production and osteocalcin secretion of human dental pulp cells in vitro. *South Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33(3):654-61
- Tholpady SS, Freyman TF, Debiie C, OGLE RC. Tensional Forces Influence Gene Expression and Sutural State of Rat calvariae In Vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120:601-11
- Vlasselaer P, Borreman B, Gorp U. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor- β synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol*. 1994;124(4):569-77
- Vacanti CA, Kim W, Vacanti D, Mooney B, Vacanti JP. Tissue engineered growth of bone and cartilage. *Transplantation Proceedings*. 1993;25(1):1019-21
- Vernon RB, Gooden MD, Lara SL, Wight TN. Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support alignment. *Biomaterials* 2005;26:3131-40
- Walsh S, Jordan GR, Jedderiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*. 2001;40:74-83
- Wang YM, Fei YANG, Cheng Y, YU P, Chen J, Chen GQ. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoclast. *Biomaterials*. 2004;26:755-61

Zhou S, Yates KE, Eedi K, Glowack J. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human stromal cells cultured in collagen sponges. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(1):33-44

ABSTRACT

Introduction: The research of new sources of cells for Tissue Engineering of the human bone, it is necessary because the use of the primary choice for this therapy (bone marrow cell), can result in a morbidity of the donor area and poor expansion *in vitro*. Therefore, it is important to seek other cellular sources to contribute to this therapy.

Objective: To evaluate the influence of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in the osteogenic differentiation of human dermal fibroblasts cultured in a collagen sponge.

Methods: The collagen sponges were cut in 16x2-mm sections and distributed into four groups according to the culture medium: CONTROL (DMEM culture medium); TGF- β 1 (DMEM culture medium with 10 ng/ml of TGF- β 1); OSTEOP (DMEM culture medium with 0.5 μ g/ml of ascorbic acid, 10 mmol/l of β -glycerophosphate and 10 nmol/L of dexamethasone); and OSTEOP.TGF- β 1 (osteogenic medium with 10 ng/ml of TGF- β 1). Measurements of the alkaline phosphatase (ALP) activity and the amount of osteocalcin (OC) in the supernatant, as well as measurement of the penetration of cells in the sponge by histology and measurement of calcium phosphate deposits by the Von Kossa test, were performed on days 2, 7, 14, 21, 28, and 56 .

Results: ALP activity and OC level: There were no differences between the CONTROL and TGF- β 1 groups in any of the measurements between any of the measurement points. However, the measured values were significantly lower than the OSTEOP and OSTEOP.TGF- β 1 groups. The OSTEOP.TGF- β 1 group achieved significantly higher. Interaction Cell/Sponge: in all groups the cells were at the top of sponge in the beginning and there were a penetration into the sponge up to the end of the experiments. Deposits of Calcium Phosphate: There were no presence of deposits in the CONTROL and TGF- β 1 groups. There were evidence of the deposits in the OSTEOP. and OSTEOP. TGF- β 1 groups from the 14^o day up to 56^o day.

Conclusion: TGF- β 1 in osteogenic medium increased the ALP activity and the OC levels but did not influence the interaction cell/sponge and the presence of mineralized deposits of calcium phosphate into the collagen sponge.

APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

para a coleta de Pele Humana

1 – Título do projeto: TGF- β 1 em Fibroblastos e Humanos Cultivados em Esponja de Colágeno

2 – Tipo de estudo : experimental *in vitro* (em laboratório) com o objetivo de avaliar a proliferação e diferenciação de fibroblastos e adipócitos na presença de TGF- β 1 cultivados em meio osteogênico; “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, o qual tem por objetivo obter informações importantes para um entendimento melhor do cultivo de fibroblastos e adipócitos, que são células presentes na pele e na gordura do corpo humano, e que podem de alguma maneira ajudar no tratamento e na recuperação do tecido ósseo humano”.

3 – O seu ato operatório transcorrerá normalmente, sem nenhuma alteração, nenhum prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será coletada a **pele** que for retirada durante a cirurgia e que seria desprezada (porque já não tem mais utilidade), para ser enviada ao laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

4 – Não existem desconfortos e riscos ao paciente.

5 – Não há benefício direto para o participante.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Antonio Carlos Aloise que pode ser encontrado no endereço (**Rua Pedro de Toledo, 781 – 4 andar, fundos**) telefone(5579.2583). Se você tiver alguma sugestão ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 –

e-mail: cepunifesp@epm.br

7 – É garantida a todos os pacientes a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e deixar de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento nesta Instituição;

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

9 – É assegurado a todos os pacientes o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, bastando para isto que entre em contato com o Dr. Antonio Carlos Aloise no endereço (**Rua Pedro de Toledo, 781 – 4 andar, fundos**) telefone (5579.2583).

10 – Não há despesas (pagamentos) pessoais para o participante em nenhuma fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga através do orçamento da pesquisa.

11 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12 – Existe um compromisso do pesquisador de utilizar as informações e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Eu discuti com o Dr. **Antonio Carlos Aloise** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são as intenções do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu

consentimento a qualquer momento, antes ou durante a sua realização, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do
paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo
estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de setembro de 2006
CEP 1167/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANTONIO CARLOS ALOISE
Co-Investigadores: Alfredo Gragnani Filho (orientador), Anelisa Bittencourt Campaner, Christiane Speponavicus Sobral
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "TGF beta 1 em fibroblastos e pré-adipócitos humanos cultivados em malha de PGA-colágeno".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental, categoria A - cultura de células.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco.

OBJETIVOS: comparar a influência do fator de crescimento transformante B-1 na proliferação e diferenciação de fibroblastos dérmicos, periodontais e pré-adipócitos humanos cultivados em uma malha de PGA-colágeno.

RESUMO: Estudo com cultura de células, fibroblastos dérmicos, fibroblastos periodontais e pré-adipócitos humanos, cultivados em malha de PGA colágeno, com a utilização de um meio osteogênico com a adição de fator de crescimento transformante B1. Serão obtidos fibroblastos dérmicos humanos a partir de fragmentos de pele descartados de procedimentos cirúrgicos da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Serão cultivados fibroblastos periodontais humanos obtidos de fragmentos de ligamento periodontal de cirurgias de terceiros molares inclusos. As culturas de fibroblastos serão divididas, sendo uma metade semeada em meio adicionado de dexametasona, ácido ascórbico e B-glicero-fosfato, e a outra metade cultivada em meio convencional. Será realizada cultura de adipócitos a partir de tecido adiposo abdominal subcutâneo obtido de cirurgias eletivas de abdominoplastia. Os fibroblastos dérmicos, fibroblastos periodontais e pré-adipócitos serão semeados em malha de PGA-colágeno. As células serão cultivadas em meio básico ou osteogênico, acrescidas ou não de fator de crescimento TGF-B1. Será realizada avaliação após 2,4,7 e 14 dias da semeadura das células. Serão realizadas avaliações histológicas e da atividade osteogênica (avaliação da osteocalcina, da atividade da fosfatase alcalina e do nível de mineralização da malha de PGA-colágeno.).

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo in vitro, com cultura de células obtidas de tecidos que seriam descartados após procedimento cirúrgico. Estudo visa avaliar crescimento celular de fibroblastos e adipócitos em malha de PGA colágeno, estimulados por TGF beta-1.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritas as técnicas utilizadas, não havendo risco adicional ao paciente.

TCLE: apresenta TCLE para ser apresentado aos pacientes que cederão material para a cultura de células.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: não se aplica.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 10/9/2007 e 4/9/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

FONTES CONSULTADAS

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE- Resolução nº 01/88: normas de pesquisa em saúde. Bioética, 3:137-54,1995

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. www.bireme.br –terminologia em saúde.

ORIENTAÇÃO NORMATIVA PARA ELABORAÇÃO E APRESENTAÇÃO DE TESES. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica UNIFESP- 2008

ROTHER, EDNA TEREZINHA: Como elaborar sua tese: estrutura e referências 2a ed. rev. e ampl. São Paulo-SP, 2005 122 pgs

Internacional Committee of Medical Journal Editors - ICMJE. Uniform Requirments for Manuscripts Submmited to Biomedical Journals: Sample References [Cited 2006 Abr 01].
wttp://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirments.html.

HOUAISS A. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. São Paulo: Objetiva; 2004.

FERREIRA ABH. Aurélio: novo dicionário da língua portuguesa. 2.ed. rev. aum. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1986.