

Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea

Rhyna C. C. Costa¹

Fúlvio B. Miguel²

Fabiana Paim Rosa³

Resumo

A possibilidade de regeneração de tecidos e órgãos com algum tipo de dano biológico tem-se constituído numa preocupação notável ao longo dos séculos. Reconstruções ósseas adequadas dependem da regeneração tecidual desencadeada pela atividade de células-tronco mesenquimais. No entanto, o conhecimento da origem e das características fenotípicas dessas células, como também dos fatores que as governam, durante as etapas de formação e remodelação ósseas, é limitado. Técnicas de investigação sobre a sua replicação *ex vivo* e posterior implantação *in vivo* estão, atualmente, sendo implementadas. Por sua vez, recentes avanços na área de biomateriais têm concentrado esforços para a sua apropriada aplicação clínica. Este trabalho tem como objetivo revisar os aspectos mais relevantes acerca do emprego das células-tronco mesenquimais nas estratégias da bioengenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: engenharia tecidual; células-tronco mesenquimais; reconstrução óssea.

INTRODUÇÃO

A Bioengenharia Tecidual e a Medicina Regenerativa compõem novas áreas que investigam técnicas de regeneração tecidual a partir de marcadores naturais (fatores de crescimento) e componentes do próprio organismo (células-tronco mesenquimais) (ROSE; OREFFO, 2002). Assim, são duas vertentes de especial interesse e de mudanças céleres, as quais envolvem progressos exponenciais, principalmente na medida em que pesquisadores, envidando esforços para o avanço das bases científicas que as norteiam, aproximam-se da aplicação clínica do

objeto de sua investigação, elaborando, por conseguinte, novos parâmetros para produção de tecidos *in vitro*, assim como para a elaboração de procedimentos que envolvam reparo e regeneração teciduais *in vivo*.

Em contraste com outros tecidos, o osso é remodelado de forma contínua, durante toda a vida da maioria dos vertebrados, inclusive o homem. Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem, nas mais variadas situações clínicas, a reconstrução tecidual, que devolve integridades funcional e mecânica, constitui-se num passo

¹ Mestranda em Clínica Odontológica na Faculdade de Odontologia da UFBA. Salvador - BA

² Mestrando em Clínica Odontológica na Faculdade de Odontologia da UFBA. Prof. Substituto de Patologia Geral do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Salvador - BA

³ Professora Adjunto de Patologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Salvador - BA

Correspondência para / Correspondence to:

Fabiana Paim Rosa

Departamento de Biointeração. Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela

CEP: 40.110 - 100 Salvador - Bahia - Brasil

Tel.: (71) 3245-8602 e (71) 3245-8339

E-mail: fabianapaim@uol.com.br

necessário para a reabilitação do paciente. A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais. No entanto, procedimentos de enxertia e substituição óssea são freqüentemente necessários, especialmente, em Ortopedia e em intervenções bucomaxilofaciais, quando da existência de defeitos extensos decorrentes de traumas, procedimentos cirúrgicos e deformidades ósseas congênitas (CANCEDDA et al., 2002).

REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO

Há aproximadamente quatro décadas, descobriu-se a potencialidade de as células-tronco hematopoiéticas diferenciarem-se em múltiplos tipos distintos. Não mais que há duas décadas, as primeiras células-tronco embrionárias murinas foram isoladas e submetidas à proliferação *in vitro*. E há apenas quatro anos, os primeiros relatos sobre a pluripotencialidade das células-tronco embrionárias removidas de blastocistos e fetos humanos abortados foram realizados.

Apesar da existência de questões éticas envolvidas, o poder científico na manipulação dessas células torna-se ilimitado, na medida em que as suas características fenotípicas sejam adequadamente mapeadas. Assim, a bioengenharia tecidual é uma área sem fim aparente, onde os maiores percalços residem na aplicação clínica dos seus achados *in vitro*.

Na estratégia da bioengenharia do tecido ósseo, o transplante autólogo de células é um dos mais prósperos conceitos em desenvolvimento, na medida em que elimina a morbidade do sítio doador, em intervenções que envolvem enxertia autógena, suprime reações de imunogenicidade inerentes a procedimentos que utilizam enxertos alógenos, assim como evita o risco de insucessos que permeia regimes terapêuticos à base de implantes aloplásticos (VACANTI et al., 1998) na reconstrução das estruturas envolvidas.

Torna-se premente, portanto, estabelecer condições para que o tecido ósseo possa se rege-

nerar em situações clínicas consideradas inóspitas, como em locais que apresentem suprimento sanguíneo comprometido, em áreas de difícil consolidação, em regiões que possuem defeitos com dimensões críticas, em levantamentos de seio maxilar, onde o osso é conduzido a se formar em condições isentas de carga, ou onde o tecido esteja completamente ausente. Para a maioria dessas aplicações, uma fonte celular é imprescindível (BOYAN et al., 1999).

Dessa forma, as células-tronco mesenquimais proporcionam, ao menos teoricamente, essa inesgotável fonte celular que, a depender do tipo e do fator de crescimento envolvido, pode originar determinado tecido ou vários tecidos do corpo, tais como ósseo, cartilaginoso, adiposo, fibroso, muscular e medular. Os fatores de crescimento, por sua vez, desempenham papel fundamental no controle da proliferação e diferenciação desses tipos específicos de células (CANCEDDA et al., 2002).

Assim, células-tronco são comumente definidas como células multipotentes, com capacidade de se diferenciarem em um ou mais tipos de células especializadas. Em bases teóricas, podem ser retiradas de um determinado paciente, incorporadas a uma matriz tecidual *ex vivo*, e implantadas no mesmo indivíduo quando o reparo tecidual se tornar essencial, evitando-se medidas protocolares de imunossupressão. Durante essa incorporação, sofrem diferenciação pela indução de alterações nas condições de seu cultivo, ou ainda *in vivo*, em consequência do estabelecimento de novo microambiente fisiológico na área transplantada.

Importante ressaltar que células-tronco embrionárias são derivadas das células da camada mais interna do blastocisto ou tecido fetal gonadal. Embora não se duvide que constitua a célula-tronco de maior plasticidade, questões éticas restringem a sua manipulação, ainda que a comunidade científica e o grande público tenham concentrado atenção no seu promissor potencial para a realização de terapia celular regenerativa, envolvendo doenças que afetam órgãos importantes do corpo humano (ALISON; POULSOM; WRIGHT, 2002).

Nesta abordagem, evidencia-se que células diferenciadas, retiradas a partir de tecidos

adultos, exibem uma capacidade de proliferação muito limitada. Isso representa sérias restrições à sua expansão em cultura e ao seu uso para reconstrução tecidual *in vitro*. Assim, em particular, as células indiferenciadas de indivíduos adultos e de origem hematopoiética parecem corresponder às mais versáteis, originando diversas linhagens celulares e sendo aparentemente capazes de se diferenciarem em muitos outros tipos, num fenômeno dito transdiferenciação (ALISON; POULSON; WRIGHT, 2002).

Uma descrição extremamente simplista pode resumir o procedimento de reconstrução óssea a partir de células-tronco mesenquimais, provenientes de um determinado volume dessas células, como sendo: a) isolamento das células em cultura, b) posterior expansão das mesmas *ex vivo*, c) cultivo e transporte dessas células por meio de uma substância carreadora e d) implantação local. No entanto, por se tratar de reconstrução tecidual extremamente complexa, uma vez ser o tecido ósseo estrutura tridimensional com componentes internos, e apresentar taxa de renovação tecidual marcadamente inferior à pele ou sangue, pode-se presumir que esse remodelamento corresponda a uma etapa de longa duração (BIANCO; ROBEY, 2001).

De forma geral, exaustivas investigações se impõem para o estabelecimento adequado desse regime protocolar, como também, para a prática clínica (BISHOP; LEE; POLAK, 2002). Problemas de acessibilidade a esses espécimes celulares, baixa frequência (por exemplo, na medula óssea existe cerca de uma célula-tronco para cada 100.000 células constituintes), podem se constituir em aspectos que restrinjam a sua aplicação no desenvolvimento de técnicas de bioengenharia tecidual (VOGEL, 2001), ainda que avanços tecnológicos tenham se configurado no sentido de prover, desde desenhos aprimorados de matrizes osseocondutoras, como implementação de terapias celulares e genéticas, o que determina a instituição de recursos inusitados para emprego em situações singulares (BOYAN et al., 1999).

Abukawa e colaboradores (2003), buscando técnicas menos invasivas para procedimentos bucomaxilofaciais de reconstrução ós-

sea, isolaram células-tronco mesenquimais, oriundas da medula óssea de três animais da espécie suína, submetendo-as à técnicas de cultivo. Concomitantemente, matrizes osseocondutoras biodegradáveis foram obtidas a partir de moldes de estruturas condilares híbridas de animais de mesma espécie. Após todos os cuidados necessários na construção e preservação de tais matrizes e na replicação das células isoladas, foram utilizados suplementos osteogênicos (100nm de dexametasona, 50 ug/ml de ácido ascórbico e 10nm beta-glicerofosfato) na indução da sua diferenciação em células ósseas. Após três dias, os osteoblastos recém diferenciados foram introduzidos e mantidos por seis semanas juntos à matriz osseocondutora, num sistema rotacional chamado de biorreator, capaz de proporcionar tensão de oxigênio suficiente para a sua replicação. Depois de 42 dias de incubação, a superfície celular foi avaliada, usando-se um microscópio com aumento de cinco vezes. Os autores consideraram satisfatória a construção de tecido ósseo autólogo, associado ao uso de polímero sintético biodegradável e células mesenquimais. Pontuaram, ademais, a natureza conservadora da técnica empregada e a aplicação promissora do uso de biorreatores na adequada mineralização óssea, a partir de osteoblastos replicados, e ainda que a técnica de bioengenharia conduziu a uma estrutura consistente, branca e com a forma similar a de um côndilo de porco híbrido. Preconizaram por fim, que a combinação entre exposições endoscópicas com a bioengenharia tecidual permitirá que deformidades adquiridas ou congênicas possam ser corrigidas com um relativo baixo custo e mínimo internamento hospitalar.

Baseado no conceito de resposta celular por remodelação óssea em razão de requerimentos funcionais, a aplicação de estresse mecânico em sistemas celulares sob cultivo talvez seja importante na sua bioengenharia tecidual. Os biorreatores desenvolvidos por Hidetomi Terai, em 2002, produzem ótimas concentrações de oxigênio e uma carga (força) contínua, produzida a partir de pressão hidráulica sobre a cultura de células, ora implantada na matriz osseocondutora. Tem sido demonstrado que o

tecido ósseo proveniente desse protocolo de reconstrução é formado por uma matriz densa e adequadamente mineralizada. Não obstante, até o momento, o tecido ósseo com a sua inerente vascularização ainda não foi satisfatoriamente reconstruído *ex vivo*. Virtualmente, existem duas alternativas para se superar essa questão: implantar uma matriz não vascularizada e permitir invasão vascular *in vivo*, ou utilizar técnicas microscópicas de bioengenharia para se produzir osso vascularizado (ABUKAWA et al., 2003). Uma das limitações dessa técnica investigada constituiu-se na formação óssea superficial.

Para uso clínico, uma penetração celular mais profunda é necessária para reconstrução de osso funcionalmente adequado. No entanto, é plausível que só se atinja essa formação óssea uniforme quando a técnica de vascularização do tecido reconstruído estiver dominada.

Yamada e colaboradores (2003) testaram o uso de uma combinação de gel à base de fibrina com beta-fosfato tricálcio, como substâncias carreadoras biodegradáveis, e células-tronco mesenquimais na formação óssea heterotópica em ratos. O gel de fibrina é composto de fibrinogênio e trombina, funcionando como uma relevante matriz, com potencial condutor biológico para transplantação tecidual, em função de sua comprovada biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de favorecer adesão celular. Células-tronco mesenquimais em proliferação foram removidas de fêmures de ratos, fragmentadas e misturadas ao gel, sendo dispostas em seringas. Em seguida, foram injetadas no tecido subcutâneo do dorso de quinze ratos de igual linhagem dos que forneceram as células-tronco mesenquimais. Oito semanas após a implantação, a avaliação macroscópica demonstrou a existência local de massa opalescente e de consistência firme. Histologicamente, observou-se a presença de estrutura óssea recém formada em todas as áreas que sofreram injeção do material, mas nenhuma nos sítios-controle, que receberam o gel sem as células-tronco mesenquimais. Adicionalmente, osteopontina, uma proteína importante no desenvolvimento ósseo, foi identificada por meio de técnicas de imunohistoquímica. Os autores concluíram que a mistura em evidência pode levar à formação

óssea com êxito, possibilitando a regeneração de defeitos e reconstrução anatômica e funcional com mínima invasão tecidual, pela geração autógena de tecido ósseo.

Schneider e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade do tecido ósseo transplantado no dorso de ratos, e formado a partir da remoção e cultivo adequado de células-tronco mesenquimais, provenientes de fêmures, tíbia e úmero de animais de mesma linhagem, em responder a fatores biológicos sistêmicos de maneira similar ao osso local pré-existente. Assim, com o objetivo de investigar essa possível remodelação óssea, foi administrado, de forma sistêmica, uma semana após o transplante celular, o hormônio da paratireóide (PTH) em doses apropriadas para o estabelecimento de atividades tanto anabólicas quanto catabólicas, nos animais receptores do tecido ósseo. Seguindo-se ao sacrifício dos mesmos, vinte e um dias após a primeira administração do hormônio, foram realizados exames histológicos, histomorfométricos, radiografias e tomografias computadorizadas. Os resultados demonstraram que o tecido ósseo ectópico foi responsivo ao tratamento sistêmico com PTH, servindo assim, como um modelo *in vivo*, para se estudarem os fenômenos que envolvem a homeostase óssea. Ou seja, quando submetido a doses indutoras de atividade catabólica, revelou intensificar o seu desempenho osteoclástico, ao passo que, em doses apropriadas para o anabolismo, foi percebido um incremento na massa óssea trabecular. Conveniente apontar que o PTH desempenha papel precípua nos fenômenos de regulação extracelular de cálcio. Um dos achados mais significantes nesse estudo foi o aumento substancial no trabeculado ósseo, seguido ao tratamento com doses anabólicas do paratormônio.

Atualmente, há muito interesse nesse efeito, em vista da possibilidade do uso de agentes anabólicos no tratamento de doenças ósseas metabólicas, particularmente a osteoporose. De fato, dentre os vários agentes existentes, o PTH é visto como o mais promissor para o tratamento da osteoporose em mulheres e homens (NEER et al., 2001).

O mecanismo básico pelo qual o tratamento com o PTH, em doses anabólicas afeta

positivamente as estruturas ósseas, não está completamente elucidado, ainda que esse efeito tenha sido associado ao aumento na proliferação e diferenciação das células osteogênicas (NISHIDA et al., 1994), como também na prolongação do tempo de atividade dos osteoblastos (JILKA et al., 1999).

Extremamente oportuno é acentuar que esse modelo de estudo vai muito além da aplicação de células-tronco mesenquimais com vistas à regeneração tecidual óssea. Tendo sido demonstrado que o osso recém formado se comporta de forma similar ao osso normal, as estratégias de terapia celular regenerativa, dentro do universo da bioengenharia tecidual, talvez possam ser utilizadas em conjunção com agentes anabólicos para amplificação e otimização da formação óssea em sítios de regeneração tecidual. Dessa forma, adicionando um estímulo fisiológico à atividade regenerativa do osso em reconstrução, talvez se propicie a constituição de tecido ósseo que mais efetivamente mimetize o osso normal pré-existente (SCHNEIDER et al., 2003).

Sugiyama e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade de células-tronco mesenquimais, de origem hematopoiética, modificadas geneticamente por transdução, em formar osso em ratos imunocompetentes. Por meio de vetores de adenovírus, expressou-se um fator de crescimento importante na osseoindução (*Bone morphogenetic proteins* - BMP). Na presença desse fator, as células apresentam um fenótipo caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, um marcador da sua diferenciação em osteoblastos, e também produção da osteocalcina. Quatro semanas após a injeção das células-tronco modificadas geneticamente no tecido muscular dos ratos, radiografias detectaram a presença de ossículos na região. Mais ainda, após oito semanas, análises histológicas demonstraram a presença de osso completamente formado, incluindo osso cortical e medular, nos respectivos sítios. Ficou comprovada, então, a formação óssea em ratos imunocompetentes, pela injeção de células-tronco geneticamente modificadas, não submetidas a cultivo e diferenciação em células osteogênicas *ex vivo*.

A osseoindução é mediada por diversos mecanismos relacionados à proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, assim como pela sua habilidade em sintetizar matriz óssea (KATAGIRI et al., 1994). As proteínas morfogenéticas participantes do metabolismo ósseo correspondem a fatores de crescimento com relevantes propriedades osseoindutoras, incluindo a capacidade de induzir formação óssea heterotópica *in vivo* (URIST; DeLANGE; FINERMAN, 1983). Também tais proteínas apresentam a capacidade de induzir ossificação endocondral em sítios portadores de fraturas e, assim, serem potencialmente úteis em acelerar o reparo ósseo. A sua injeção de forma isolada, sem substâncias carreadoras, no entanto, induz a pequena formação óssea em animais imunocompetentes, como também a uma severa inflamação local. Uma das maneiras para contornar essas dificuldades é associar a sua implantação nos referidos sítios às células-tronco mesenquimais (SUGIYAMA et al., 2003).

A transferência genética, mediada por vetores de adenovírus, por sua vez, configura-se como eficiente sistema para liberação das diversas formas recombinantes de fatores de crescimento *in vivo*, especialmente apropriado nesse caso, uma vez que a sua sinalização, sem o fenômeno da transdução genética, leva a uma indução de formação óssea demorada, que envolve, por vezes, semanas. Dessa forma, a sua ligação temporária a substâncias carreadoras, pela expressão gênica mediada pelo adenovírus, seria, portanto, suficiente para tratar fraturas e defeitos ósseos, visto que a produção crônica dessa proteína não se faz necessária nessas situações. Muito embora o estudo tenha demonstrado que a implantação das células-tronco mesenquimais modificadas geneticamente obteve êxito na formação óssea em ratos imunocompetentes, remanesce a dúvida sobre se essas células apenas funcionam como carreadoras do fator de crescimento osseoindutor ou se, efetivamente, elas se transdiferenciam em osteoblastos *in vivo* (SUGIYAMA et al., 2003).

Para esclarecer tal questão, torna-se indispensável testar a utilização de substâncias carreadoras para as células geneticamente mo-

dificadas, fazendo com que as mesmas se mantenham concentradas num determinado sítio e que o mesmo, após sua implantação, possa ser examinado com vistas a se detectar a presença de células ósseas originadas a partir de células osteogênicas.

CONCLUSÃO

A bioengenharia tecidual tem participação imperativa nas terapias regenerativas ósseas.

Estudos *in vitro* e *in vivo* com células-tronco mesenquimais associadas aos biomateriais para o reparo tecidual têm apresentado resultados promissores na aplicação clínica.

As evidências científicas revistas no nosso trabalho, assim como a constatação dos avanços mencionados, sugerem que estudos prospectivos são necessários para ratificar a sua aplicação clínica.

Tissue engineering strategies in the bone reconstruction

Abstract

The possibility of regeneration and repair of damaged tissues and organs has been a major concern for centuries. Appropriate bone reconstruction depend on the tissue engineering promoted by the Mesenchymal stem cells. However, the knowledge about their origin and fenotypical features, as wel as, about the growth factors that govern their activities and the steps related to tissue regeneration is limited. Practical methods involving the ex vivo expansion and in vivo transplantation of the stem cells are currently being tested. On the other hand, recent advancements in the biomaterial field have concentrated efforts towards its clinical application. This paper seeks to review the most important aspects of the Mesenchymal stem cells in the strategies of bony tissue engineering.

Keywords: *tissue engineering; mesenchymal stem cells; bone reconstruction.*

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. et al. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, p.94-100, 2003.
- ALISON, M.R.; POULSOM,R.; WRIGHT, N.A. Preface to stem cells. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.197, p.417-418, 2002.
- BIANCO, P; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, London, v.414, n.1, p.118-121, Nov. 2001.
- BISHOP, A.E.; LEE, D.K.B.; POLAK, J.M. Embryonic stem cells. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.197, p.424-429, 2002.
- BOYAN, B. D. et al. Bone and cartilage tissue engineering. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v.26, n.4, 629-641, Oct. 1999.
- CANCEDDA, R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biol.**, Stuttgart, v.22, n.1, p.81-91, Mar. 2003. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 16 abr. 2003.
- JILKA, R. L. et al. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. **J. Clin. Invest.**, Thorofare, v.104, p.439-446, 1999.

- KATAGIRI, T. et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. **J. Cell. Biol.**, New York, v.127, p.1755-1766, 1994.
- NEER, R. M. et al. Effect of parathyroid hormone on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, p.1434-1441, 2001.
- NISHIDA, S. et al. Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. **Bone**, New York, v.15, p.717-723, 1994.
- ROSE, F.R.; OREFFO, R.O. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v.292, p.1-7, 2002.
- SCHNEIDER, A. et al. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. **J. Orthop. Res.**, New York, v.21, n.5, p.859-864, Sept. 2003.
- SUGIYAMA, O. et al. Bone formation following transplantation of genetically modified primary bone marrow stromal cells. **J. Orthop. Res.**, New York, v.21, n.4, p.630-637, Jul. 2003.
- URIST, M.R.; DeLANGE, R.J.; FINERMAN, G.A. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, Washington, DC, v.220, p.680-686, 1983.
- VACANTI, J.P. et al. Beyond transplantation. **Arch. Surg.**, Chicago, v.123, p.545-549, 1998.
- VOGEL, G. Can adult stem cell suffice? **Science**, Washington, DC, v.292, p.1820-1822, 2001.
- YAMADA, Y. et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Edinburgh, v.31, p.27-33, 2003.

Recebido em / *Received*: 12/03/2004
Aceito em / *Accepted*: 27/10/2004