

Projeto FAPDF – Demanda Induzida 03/2021
Coordenador(es): Prof. Alysson Martins Almeida Silva - UnB
Profa. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira - UFAM

Osteogênese por cultivos celulares diferenciados e mesenquimais associado a fibrina leucoplaquetária autóloga em suporte produzido por freeze casting

1.1. INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas são um grave problema de saúde pública no mundo. Estima-se que 50% das mulheres e 25% dos homens sofram pelo menos uma fratura durante a vida devido à fragilidade óssea com diferentes causas, sendo a osteoporose uma das mais importantes. (Dennison et al., 2006, Roux et al., 2014). O impacto epidemiológico dessas fraturas, considerando as taxas de morbidade e mortalidade e os custos de saúde, é um problema de proporções globais, especialmente com o envelhecimento da população.

As fraturas proximais do fêmur são a principal causa de morte relacionada a quedas nos idosos, responsáveis por cerca de 340.000 internações/ano nos Estados Unidos, a um custo aproximado de três bilhões de dólares (Porter et.al., 2008, Griffiths et.al.,2012). Este tipo de fratura atinge, com maior frequência, a população de idosos, sendo 95% acima de 60 anos e do sexo feminino (75%) (Rodrigues, et. al. 2002). Em virtude da frequente ocorrência de doenças associadas nesses pacientes, a taxa de mortalidade nos primeiros 30 dias após a fratura atinge de 5% a 10%, chegando a 15% a 30% no primeiro ano (Porter et.al., 2008, Griffiths et.al.,Shiga et.al., 2008, Bryson et.al., 2008.)

Todos os métodos terapêuticos aplicados às fraturas baseiam-se no potencial de restauração morfofuncional do tecido ósseo (redução), neutralização das forças biomecânicas (imobilização), preservação da fisiologia, restauração do comprimento, alinhamento, reconstrução da superfície articular e preservação das partes (funcionalidade biomecânica) (Gardner et al., 1984).

Autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos e enxertos aloplásticos têm sido usados no processo de reparo e regeneração óssea. Um autoenxerto é derivado do mesmo indivíduo que receberá o enxerto. Embora seja considerado o padrão ouro dos enxertos ósseos, uma vez que induz formação e regeneração ósseas através de osteogênese, osteoindução e osteocondução, sua utilização é limitada devido a disponibilidade limitada de tecido ósseo e também devido a adição de processos cirúrgicos ao qual o indivíduo tem que ser submetido. Aloenxerto é quando o tecido a ser enxertado é proveniente de outro indivíduo da mesma espécie do recipiente. Também possui propriedades osteoindutoras devido a presença de componentes naturais e fatores de crescimento. Os xenoenxertos são provenientes de espécies

diferentes daquela do receptor, apesar disso, esse tipo de enxerto ainda fornece uma matriz arquitetônica natural e é uma excelente fonte de cálcio e fosfato para a regeneração. Aloenxertos e xenoenxertos têm o risco potencial de transmissão de doenças. Aloplásticos são materiais sintéticos que podem ser desenhados com várias composições químicas, formas físicas e configurações de superfície para o reparo de defeitos ósseos ou para o estímulo de crescimento ósseo. Eles apresentam apenas propriedades osteocondutoras, assim limitando sua capacidade reparadora. No caso de regeneração óssea, os enxertos são eventualmente remodelados e substituídos por osso novo no tecido hospedeiro. Devido a limitação de materiais para esses enxertos ósseos, a engenharia de tecidos procura uma nova abordagem através da interação entre suportes inorgânicos e células vivas

O uso de diferentes materiais de fixação (osteossíntese), como fios metálicos, placas, parafusos, pregos intramedulares ou mesmo próteses, é utilizado por ocasião de lesões ósseas (Gonçalves et al., 2018). A indicação do uso de materiais metálicos será baseada na capacidade de alcançar boa redução, estabilidade mecânica, eliminação de riscos de infecção e potencial de resposta biológica (consolidação). A presença de um material metálico estável, biologicamente inerte, pode funcionar como um substrato de adesão de proteínas para a formação de biofilme bacteriano e falha do processo regenerativo (pseudartrose).

A crescente demanda por métodos baseados em diferentes matérias-primas que permitam a restauração funcional de tecidos lesionados, tem sido o fator norteador na produção de materiais de implante. Entre estes, os mais comuns são aço inoxidável, ligas de titânio ou ligas à base de cromo-cobalto, molibdênio ou tântalo, cuja alta densidade, resistência, estabilidade física e compressibilidade são os fatores que suportam suas aplicações (Pires et al., 2015). No entanto, apesar da grande aplicabilidade desses materiais, uma vez implantados, eles se tornam suscetíveis à resposta imunológica do indivíduo e a ação de enzimas além de estarem expostas a diferentes cargas biomecânicas que podem gerar ciclos de fadiga, microfaturas e falhas estruturais, causando instabilidade do local lesionado, falha biológica do processo de consolidação, liberação de partículas metálicas (metástases), reação periosteal, osteólise e liberação do implante (Smith & Hashemi 2012; Razak et al., 2014).

A ausência de biocompatibilidade dos implantes pode ser atribuída à falta de canais ou poros que impeçam a osteocondução, mas também porque são biologicamente inertes, não são capazes de promover a sua integração com as células osteoprogenitoras (osteoindução). O efeito mecânico da diferença do módulo de elasticidade entre os ossos (3 a 20 GPa) e as ligas metálicas (30 a 200 GPa) (Staiger et al., 2005), induz o tecido ósseo ao efeito de reabsorção (osteopenia) e consequente desintegração na área de consolidação provocada pela menor distribuição da carga mecânica no tecido ósseo e redução do efeito piezoelétrico da captação de íons de cálcio (Holzapfel et al., 2013). Outro fator relevante nos procedimentos que requerem o uso de implantes metálicos é a persistência de um processo inflamatório associado à colonização por agentes infecciosos multirresistentes. Quando há sinais de afrouxamento e falha estrutural do implante por infecção, é fundamental que o procedimento terapêutico de escolha considere que o implante nessas condições apresenta um perfil biológico que favorece a manutenção do processo inflamatório. Na população idosa, na qual a resposta imune é deficiente, a presença de materiais metálicos inertes pode levar à persistência de infecções crônicas que culminam na

liberação e perda da prótese, além do desenvolvimento de sepse e morte (20 a 35%) (Pereira et al. 2010; Ricci et al. 2012; Meessen et al. 2014; Guerra et al. 2017).

Face ao problema apresentado, a investigação aplicada ao desenvolvimento de implantes biocompatíveis que possuam uma estrutura de poros interligados, permitindo a difusão de nutrientes e oxigênio (osteocondução) deve ser estimulada. Estes materiais devem ser não imunogênicos, com um coeficiente de elasticidade próximo a do osso e, além disso, proporcionar um microambiente adequado para a incorporação de células e fatores de crescimento necessários à reparação tecidual (Hollister 2005; Salerno et al. 2012). No entanto, como a porosidade compromete a estabilidade estrutural desses materiais, é necessário um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e o transporte de massa biologicamente eficaz para consolidação. Os fatores, assim, a serem considerados no desenvolvimento de implantes são a estrutura porosa, a fração volumétrica dos sólidos, as propriedades intrínsecas dos materiais (peso molecular, calor específico, etc.), bem como a capacidade de incorporação celular dentro da estrutura das retículas.

A relevância do desenvolvimento de materiais com as propriedades biocompatíveis pode ser observada no investimento disponível para a produção de dispositivos ortopédicos, que deve atingir US\$ 11,77 bilhões até 2023, com um crescimento de 7,38% na taxa anual segundo dados publicados pela Infoholic Reseach LLP, 2017 (Infoholic Reseach 2017). Nos últimos anos, vários métodos de processamento de materiais têm sido desenvolvidos na produção de implantes metálico-cerâmicos. Dentre esses métodos, destacam-se a replicação de espuma de polímero, pirólise precursora e sinterização (Jun et al, 2006; Lyckfeldt & Ferreira 1998). Um método especial, denominado freeze casting, tem merecido especial atenção devido à sua simplicidade, flexibilidade e possibilidade de utilização de várias matérias-primas biocompatíveis e baixa toxicidade tecidual (Silva et al., Silva et al., 2016). Baseado nesta técnica e na metodologia descrita em detalhes ao longo deste projeto, têm-se por objetivo desenvolver novos materiais cerâmicos com estrutura porosa controlada que possa ser utilizado em substituição aos materiais hoje disponíveis no mercado e avaliar suas propriedades biológicas através da cultura desses materiais com células tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo ou de cordão umbilical humanas e murinas.

1.2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a população de idosos no Brasil vem crescendo de forma rápida, estimando-se que, em 2030, ela represente 13,44%¹ do total da população. No censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2010, o número de idosos era de 20.438.561, representando 11,8% da população. Desse percentual, 45,12% tem entre 70 e 79 anos, percentual maior do que o observado nas estatísticas anteriores, demonstrando o aumento da expectativa de vida, que hoje é de 74 anos. A razão de dependência dos idosos em 2014 era de 11,1 % e, em 2030, estima-se que será de 19,49% segundo próprio estudo do IBGE já citado. Em estudo publicado em 2014 por Luci Moraes, intitulado “GASTOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE E ESTIMATIVA DE IDOSOS COM OSTEOPOROSE TRATADOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE DO BRASIL NO TRIÊNIO 2008 – 2010” (Tese de Doutorado), mostrou que o Brasil neste período (2008-2010) realizou 3.252.756 procedimentos relacionados ao tratamento de osteoporose que totalizaram R\$288.986.335,15. O maior número de procedimentos foi realizado em pacientes na faixa etária de 60-69 anos (46,3%); 76%

dos gastos e 95,6% dos procedimentos foram feitos na população feminina. Os procedimentos ambulatoriais predominaram em quantidade (96,4%) e os hospitalares em recursos (70,4%).

Os casos cirúrgicos demandam próteses metálicas que, apesar de biologicamente inertes, resistentes e densas, são expostas às células do sistema imunológico e a diferentes cargas biomecânicas, causando fadigas, microfraturas, liberação de partículas metálicas, falhas na consolidação e osteólise. Além disso, a ausência de porosidade impede a osteocondução e a osteoindução causando osteopenia e a soltura do implante. Assim, é fundamental desenvolver próteses com microambiente para a integração celular, a circulação de nutrientes e fatores de crescimento. Nosso desafio é induzir *in vitro* parte do espectro do processo osteogênico que ocorre *in vivo* pelo cultivo de células mesenquimais (CM) numa matriz cerâmica similar ao osso (MCSO) estimuladas a diferenciação pela fibrina leucoplaquetária autóloga (FLA). Nossa hipótese é que nessas condições, as CM se diferenciarão em células osteogênicas promovendo a integração, a reabsorção da MCSO, a osteoindução e a osteoremodelação.

Os fundamentos desse projeto de pesquisa encontram-se três sistemas de estudo: A) a matriz cerâmica similar ao osso natural como substrato da osteocondução; B) as células mesenquimais multipotentes e mitogênicas; C) a fibrina leucoplaquetária autóloga (FLA) que abriga os fatores proteicos de crescimento e diferenciação celular.

A hipótese desse projeto é de que a matriz cerâmica porosa produzida por fosfatos de cálcio apresentando características estruturais similares ao osso normal (hidroxiapatita) serviria como suporte para colonização e rearranjo estrutural (osteocondução) pelas células mesenquimais. As células mesenquimais humanas (hMSCs) apresentam capacidade para diferenciar-se em linhagens cardíacas, adiposas, condrocíticas ou osteoblásticas, representando uma fonte renovável de células do próprio paciente durante seu processo de regeneração tecidual (1,2,3,4). Além disso, Por ter baixos níveis de antígenos leucocitários humanos, esse tipo celular humano modula a resposta imunológica ao invés de provocá-la, o que o coloca mais uma vez em posição de destaque como candidata nos processos de reconstituição tecidual (5,6). Este tipo celular pode ser isolado de uma variedade de tecidos, sendo que entre eles estão o tecido do cordão umbilical e o tecido adiposo. Estas células, na presença da fibrina leucoplaquetária autóloga não polimerizada, serão induzidas a se diferenciar nos tipos celulares relacionadas ao tecido ósseo (condroblastos, osteoblastos e osteoclastos), promovendo a reabsorção da matriz (osteoclastos) e a produção de uma nova matriz óssea pelos osteoblastos (osteoindução).

O estímulo que norteia esse desafio baseia-se na alta taxa de morbimortalidade associada às complicações advindas de infecções e rejeição bem como a soltura dos implantes biologicamente inertes, sobretudo em indivíduos idosos. Também deve-se levar em consideração o alto custo do tratamento dada a necessidade de troca das próteses pela reabsorção óssea e pela soltura dos implantes que comumente ocorre cerca de 10 anos depois do procedimento.

A metodologia proposta pode contribuir substancialmente para a consolidação de fraturas, difusão do uso de enxertos advindos da engenharia de tecidos, desenvolvimento de implantes biocompatíveis, biodegradáveis, modeláveis e de grandes dimensões, não imunogênicos e de baixo custo.

O projeto aborda toda a população, não só brasileira como mundial, uma vez que estão todos sujeitos a alguma fratura ao longo da vida.

1.3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

1.3.1 OBJETIVO GERAL

O Projeto visa desenvolver materiais com estrutura similar ao osso natural que sirvam como próteses totalmente biocompatíveis. Pretende-se, portanto, promover soluções viáveis a substituição de próteses atualmente metálicas disponíveis no mercado e em constante uso pelo Sistema Único de Saúde – SUS e que apresentam certa toxicidade e alto custo. A rejeição do organismo humano devido a esta toxicidade gera significativo incremento de custo ao tratamento tanto na rede pública de saúde como na rede privada devido à necessidade de re-internações dos pacientes para tratamento e além da promoção de uma redução drástica na qualidade de vida dos mesmos.

Primeiro Objetivo: Produzir diferentes suportes cerâmicos semelhantes ao osso natural pelo método de freeze casting e avaliar a sua interação e viabilidade de fibroblastos e macrófagos (J774) para selecionar candidatos para a futura produção de implantes ósseos.

Segundo Objetivo: Avaliar, em função do tempo, o processo de remodelamento do suporte cerâmico a partir de culturas de células murinas (fibroblastos e macrófagos) e de células mesenquimais humanas incubadas com um andaime cerâmico, na presença ou não de meio de cultura osteogênico ou fibrina leucoplaquetária autóloga (FLA) para aplicações biomédicas.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver, implementar, modelar e simular o crescimento dos cristais responsáveis pela estrutura de poros do suporte cerâmico sob diferentes parâmetros (listados a seguir).
- Avaliar a influência da taxa de resfriamento, da concentração de soluto e dos diferentes solventes na estrutura de poros e na resistência mecânica.
- Avaliar a influência dos dopantes SiO_2 , ZnO , TiO_2 , CoFe_2O_4 e Fe_2O_3 na estrutura dos poros e na resistência mecânica das amostras de hidroxiapatita (HA) e trifosfato de cálcio (TCP).

- Avaliar a influência da temperatura de sinterização na estrutura e na resistência mecânica dos substratos produzidos por HA, dopados com TCP.
- Avaliar a biocompatibilidade do suporte pela funcionalização de sua superfície com moléculas biomiméticas, incluindo proteínas bioativas, peptídeos e polissacarídeos.
- Avaliar a viabilidade celular para avaliar a toxicidade de dopantes.
- Avaliar e caracterizar a interação intercelular e a integração do suporte celular por microscopia estrutural e ultra-estrutural, em função do tempo.
- Isolar as células mesenquimais do tecido adiposo dos descartes cirúrgicos.
- Avaliar o efeito do meio de cultura osteogênico ou FLA em culturas de células mesenquimais e murinas humanas em suportes cerâmicos.
- Determinar as células totais e identificar os tipos de células incubadas com o suporte cerâmico.
- Avaliar e caracterizar a interação intercelular e a integração do suporte celular por microscopia estrutural e ultra-estrutural.

1.4. INTERESSE RECÍPROCO

Segundo publicado na “Agenda de Prioridades de Pesquisa do Ministério da Saúde - 2018” as linhas de pesquisa priorizadas incluem “Desenvolvimento de Tecnologia e Inovação em Saúde”, salienta-se ser a proposição do presente projeto. No PNS de 2016 a 2019 o projeto se adequa ao objetivo 07 – Produção e disseminação do conhecimento científico. O projeto também irá contribuir de maneira significativa na qualidade de vida da população.

1.5. DIRETRIZ PROGRAMA

O objetivo do projeto é desenvolver novas tecnologias e conhecimento científico relacionado a produção de novos materiais e crescimento de células mesenquimais para que possa ser aplicado a pacientes que apresentem fraturas ósseas e doenças como osteopenia. No PNS de 2016 e 2019, objetivo 07, o projeto se adequa claramente.

1.6. PÚBLICO ALVO

Projeto de desenvolvimento de biomateriais; produto final é o suporte cerâmico; resultado esperado é que o material permita crescimento e diferenciação celular e que a resistência mecânica seja similar a dos ossos; impacto esperado redução no custo de próteses, de tratamento, tempo de internação e melhoria da qualidade de vida de pacientes. **Público alvo direto:** gestores do SUS poderão reduzir os custos de tratamentos de fraturas. **Público alvo indireto:** paciente beneficiado com o desenvolvimento de novos implantes ósseos.

1.7. PROBLEMA A SER RESOLVIDO/OPORTUNIDADE

Os implantes metálicos hoje disponíveis não apresentam biocompatibilidade podendo isto ser atribuído à falta de canais ou poros que impedem a osteocondução. Estes materiais também são biologicamente inertes, não sendo capazes de promover a sua integração com as células osteoprogenitoras (osteoindução). O efeito mecânico da diferença do módulo de elasticidade entre os ossos (3 a 20 GPa) e as ligas metálicas (30 a 200 GPa) é um outro fator que induz o tecido ósseo ao efeito de reabsorção (osteopenia) e conseqüente desintegração na área de consolidação provocada pela menor distribuição da carga mecânica no tecido ósseo e redução do efeito piezoelétrico da captação de íons de cálcio. Um dos pontos relevantes nos procedimentos que requerem o uso de implantes metálicos é a persistência de um processo inflamatório associado à colonização por agentes infecciosos multirresistentes. Quando há sinais de afrouxamento e falha estrutural do implante por infecção, é fundamental que o procedimento terapêutico de escolha considere que o implante nessas condições apresente um perfil biológico que favoreça a manutenção do processo inflamatório. Os suportes cerâmicos propostos neste trabalho não apresentarão nenhum dos danos apresentados pelas próteses metálicas. Os materiais utilizados são de composição similar ao da estrutura óssea, com resistência similar e poros que permitam o fluxo sanguíneo e o desenvolvimento celular.

1.8. RESULTADO ESPERADO E IMPACTOS

Espera-se o desenvolvimento de um novo material, cuja resistência mecânica se aproxime da resistência óssea, com uma estrutura de poros controlada, com baixa toxicidade e alta biocompatibilidade. Em termos do desenvolvimento celular, ao final do projeto, deverá a diferenciação celular ocorrer de maneira efetiva, com bom desenvolvimento para que posteriormente possa-se iniciar uma nova etapa de implantação da prótese e posterior desenvolvimento comercial.

2. DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada no presente projeto não se adéqua a orientação proposta de preenchimento, logo, segue em detalhes fora de formato, a metodologia proposta dividida em duas etapas:

Primeira etapa: serão produzidas por freeze casting, via modelagem e simulação do crescimento dos cristais, matrizes cerâmicas biodegradáveis, osteocompatíveis, com porosidade baseada no equilíbrio entre as propriedades mecânicas e o transporte de massa efetiva, de grandes dimensões, modeláveis e esterilizáveis. As matérias primas serão a hidroxiapatita e Trifosfato de cálcio dopados com partículas de SiO₂, ZnO, TiO₂, CoFe₂O₄, Fe₂O₃. Serão avaliados a influência dos dopantes nas propriedades mecânicas, o efeito da temperatura de resfriamento na microestrutura, a velocidade de solidificação e a taxa de resfriamento; o canfeno, água, e terc-butanol serão utilizados como solventes. Para avaliar a interação e a viabilidade celular, cultivos de fibroblastos e macrófagos J774 serão incubados em meio D-MEM até a confluência das culturas e quantificadas em hematocítômetro; a viabilidade celular será pelo método de exclusão da nigrosina. Depois, os discos estéreis das matrizes (3 mm x 12 mm) serão incubados

com cultivos de fibroblastos e macrófagos J774, em meio D-MEM trocado a cada 2-3 dias, em condições fisiológicas por 7 ou 15.

Segunda etapa: as células mesenquimais serão obtidas de descartes lipoaspirados em parceria com duas clínicas de Brasília-DF. As normas éticas serão rigorosamente cumpridas nessa etapa que iniciará somente depois de aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina-UnB. As CM serão selecionadas por aderência mediante 4 passagens depois de alcançada a sua confluência, conforme método proposto por Bravo et al. (2012). Depois, cultivos de fibroblastos e macrófagos J774 e das CM serão incubados (7 a 30 dias) com a matriz selecionada em meio D-MEM+SFB, D-MEM osteogênico ou D-MEM+FLA (trocado de 2-3 dias) em condições fisiológicas. Em ambas as etapas e finalizados os ensaios, os discos serão fixados, removidos e fracionados para as caracterizações morfológicas por histologia, histoquímica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Tecido adiposo do omento e epidídimo de camundongos da linhagem BALB/C ou de descartes cirúrgicos humanos serão coletados. Os tecidos serão lavados, fragmentados e digeridos com uma solução de colagenase por 30 min a 37°C. Depois da digestão, a solução de colagenase será inativada com meio de crescimento (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 + 10% soro fetal bovino + 100 µg (100 IU) de penicilina e estreptomicina + 0,25 µg de anfotericina B) e as células serão centrifugadas por 200xg, 10 min para obtenção de um precipitado de células. O precipitado resultante será suspenso em meio de crescimento e 2×10^4 cells/cm² serão cultivadas em placas em estufa com atmosfera com 5% de CO₂. As células obtidas serão observadas para a presença de marcadores de superfície de células tronco (CD105, CD73, e CD45) depois de 2, 4 ou 7 passagens in vitro. As células indiferenciadas serão então cultivadas em meio osteogênico (50 µM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 0,1 µM dexametasona, e 15 mM β-glicerolfosfato) por 21 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias. A cada 3 dias as células serão observadas quanto a sua diferenciação por fixação com paraformaldeído 4% e coloração com vermelho alizarina (pH 4.1) seguido por observação em microscópio invertido com aumento de 100X. Alternativamente as células serão cultivadas com fibrina leucoplaquetária autóloga. A diferenciação das células será avaliada da mesma forma supracitada. Será posteriormente feita extração de DNA e análise dos genes expressos pelas células diferenciadas.

Depois da confirmação da capacidade de diferenciação das células isoladas, as células cultivadas eram recuperadas em solução de tripsina-EDTA e a viabilidade celular avaliada por coloração com azul de trypan. Os suportes serão incubados com as células (3×10^5 células por suporte) para adesão celular em estufa (37°C, 5% CO₂). Depois de 4h, 1 mL de meio de cultura será adicionado a cada poço contendo o suporte e as estruturas serão incubadas nas mesmas condições por um período de 4 semanas. Uma semana após o início da cultura, será adicionado em cada poço meio osteogênico (meio de cultura contendo fibrina leucoplaquetária autóloga ou meio de cultura com dexametasona, ácido ascórbico e glicerofosfato como indicado acima). O meio osteogênico será trocado a cada 4 dias.

A viabilidade celular nos cultivos com suporte será verificada por coloração com alamar blue.

Para investigação do fenótipo osteoblástico, na 2ª e 3ª semanas de cultivo será testada a atividade de fosfatase alcalina das células aderidas aos suportes.

2.2. ACOMPANHAMENTO

A cada semestre será emitido relatório de acompanhamento detalhando os resultados e o progresso da pesquisa. Reuniões mensais entre os responsáveis pelo projeto serão executadas.

2.3. FORMAS DE AVALIAÇÃO

A avaliação do projeto e dos resultados esperados será realizada semestralmente através das técnicas de caracterização essenciais ao desenvolvimento do projeto, citase: difração de raios-X, resistência mecânica, análise de porosidade, permeabilidade, desenvolvimento, diferenciação e crescimento celular, conforme proposto na metodologia.

2.4. POTENCIAIS CRIAÇÕES E INOVAÇÕES RESULTANTES DA PROPOSTA

Para a reparação tecidual as células necessitam de sinalização, adesão ao substrato/matriz e das proteínas relativas ao tecido a ser reparado, como glicoproteínas, imunoglobulinas, citocinas, fatores de crescimento e micropartículas circulantes que atuam modulando a resposta angiogênica e reparadora em sítios lesados. Células como os fibroblastos, osteoblastos e macrófagos são fundamentais na produção, crescimento e manutenção dos ossos e quando na presença de fatores de crescimento podem atuar eficazmente na reparação tecidual. Assim, o estabelecimento de protocolos, *in vitro*, referentes ao uso das células mesenquimais associadas a uma matriz cerâmica similar ao osso natural e à FLA pode trazer grandes benefícios como: 1) na taxa de consolidação de fraturas; 2) na difusão do uso de enxertos advindos da engenharia de tecidos; 3) no desenvolvimento de implantes biocompatíveis, biodegradáveis e remodeláveis *in vivo*; 4) pela ausência de toxicidade e imunogenicidade; 5) pela redução de infecções.

Considerando o impacto sócio-econômico gerado pelas fraturas ao sistema de saúde, sobretudo com o envelhecimento da população e pela redução na qualidade de vida dos indivíduos afetados e por sequelas oriundas de falhas ósseas primárias ou secundárias, espera-se com o estudo proposto apresentar uma alternativa eficaz e de baixo custo na reparação de fraturas ou perdas ósseas que demandam procedimentos para enxertias, alongamento ósseo ou substituição por próteses. Dentre os benefícios espera-se a redução no tempo de tratamento, permitindo assim, seu retorno ao convívio social e laboral com impacto positivo nos gastos públicos.

OBS: Não houve trabalho anterior desenvolvido, portanto, não há patente depositada ou a ser depositada.

2.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS SANITÁRIAS E DEMAIS AUTORIZAÇÕES LEGAIS NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROJETO

As normas éticas que regulamentam os estudos com células humanas serão cumpridas em concordância com as leis brasileiras vigentes e com a declaração de Helsinki (WMA,2008), ficando condicionado o início da segunda etapa do projeto a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de

Medicina da Universidade de Brasília. O projeto também será submetido ao comitê de ética para experimentação com animais da Universidade Federal do Amazonas.

2.6 PLANO DE DISSEMINAÇÃO DOS RESULTADOS DA PESQUISA

Os resultados serão apresentados em congressos, workshops e publicação através de jornais e artigos em revistas especializadas na área.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bryson GL. Waiting for hip fracture repair - Do outcomes and patients suffer? *Can J Anesth* 2008;55:135–139.
- Dennison E, Mohamed MA, Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006;32:617–629.
- Gardner MJ, Mehta S, Barei DP, Nork SE. Treatment protocol for open AO/OTA type C3 pilonsfractures with segmental bone loss. Report of 38 cases treated with a standard protocol. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(9):1349–56.
- Gonçalves FF, Dau L, Grassi CS, Palauro FR, Neto AAM, PereirA PCG. Evaluation of the surgical treatment of humeral shaft fractures and comparison between surgical fixation methods. *Revista Brasileira de Ortopedia.* Volume 53, Issue 2, March–April 2018, Pages 136-141.
- Griffiths R, Alper J, Beckingsale A, Goldhill D. Heyburn G et al. Management of proximal femoral fractures 2011 Association of Anaesthetists of Great Britain and Ireland. *Anaesthesia* 2012;67:85–98.
- Guerra TEM, Viana RD, Feil L, Feron ET, Maboni J, Soria-Galvarro AV. Original Mortalidade em um ano de pacientes idosos com fratura do quadril tratados cirurgicamente num hospital do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de ortopedia,* 52: 17-23, 2017.
- Hollister, S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials.* 2005, vol.4, pp. 518- 524.
- Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 4: 581-603, 2013.
- Infoholic Research LLP. *Global Orthopaedic Devices Market Trends and Drivers, Restraints, and Opportunities 2017-2023.* 2017.
- Jun IK, Koh YH, Song JH, Lee SH, Kim HE. Improved compressive strength of reticulated porous zirconia using carbon coated polymeric sponge as novel template. *Materials Letter.*2006, vol.60, pp. 2507-2510.
- Lyckfeldt O, Ferreira JMF. Processing of porous ceramics by starch consolidation. *Journal of the European Ceramic Society,* 1998, vol.18, pp.131-140.

- Meessen JM, Pisani S, Gambino ML, Bonarrigo D, van Schoor NM, Fozzato S, et al. Assessment of mortality risk in elderly patients after proximal femoral fracture. *Orthopedics*. 2014; 37(2):e194– 200.
- Pereira SR, Puts MT, Portela MC, Sayeg MA. The impact of prefracture and hip fracture characteristics on mortality in older persons in Brazil. *Clin Orthop Relat Res*. 2010; 468(7):1869– 83.
- Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*, Vol.38, No. 7, 957-971, 2015.-
- Porter SE, Russel JV, Qin Z, Graves ML. Operative Fixation of Acetabular Fractures in the Pregnant Patient. *J Orthop Trauma* 2008;22:508-516.
- Razak A, Ebinesan AD, Charalambous CP. Metal hypersensitivity in patients with conventional orthopaedic implants. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2: e1-e11, 2014.
- Ricci G, Longaray MP, Gonçalves RZ, Ungaretti Neto AS, Manente M, Barbosa LBH. Avaliação da taxa de mortalidade em um ano após fratura de quadril e fatores relacionados à diminuição da sobrevida no idoso. *Rev Bras Ortop*. 2012; 47(3):304–9.
- Rodrigues M P e Ramos L R. Fatores associados a quedas em uma coorte de idosos residentes na comunidade, Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). São Paulo, SP, Brasil, *Rev. Saúde Pública* 2002; 36(6): 709-16.
- Roux S, Cabana F, Carrier N, Beaulieu M, April PM, Beaulieu MC, Boire G. The World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool (FRAX) Underestimates Incident and Recurrent Fractures in Consecutive Patients With Fragility Fractures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014; 99: 2400–2408.
- Shiga T, Wajima Z, Ohe Y. Is operative delay associated with Increased mortality of hip fracture patients? Systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Can J Anesth* 2008;55:146–154.
- Silva, A. M. A., Nunes, E. H. M., Houmard, M. N. P. G., Souza, D. F., Martens, D. L., Costa, J. D., Vasconcelos, W. L. Effect of titania addition on the properties of freeze-cast alumina samples. *Ceramics International*, 2015, v. 41, p. 10467-10475.
- Silva, A.M.A., Nunes, E.H.M., Souza, D. F., Martens, D.L., Costa, J.D., Houmard, M., Vasconcelos, W. L. The influence of Fe₂O₃ doping on the pore structure and mechanical strength of TiO₂-containing alumina obtained by freeze-casting. *Ceramics International*, 2015, v.41, p.14049-14056.
- Smith, W. F.; Hashemi, J.; *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 5ª ed., McGrawHill: Porto Alegre, 2012.
- Staiger, M. P.; Pietak, A. M.; Huadmai, J.; Dias, G.; Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review *Biomaterials* 27: 1728-1734, 2006.

2.8. PLANEJAMENTO DA GESTÃO DE RISCOS

Eventos	Identificação dos eventos de riscos	Identificação da natureza e da categoria	Identificação das possíveis causas	Identificação do nível	Descrição dos procedimentos de prevenção	Descrição dos procedimentos de minimização	Estratégias de monitoramento do plano de gestão de riscos.
I	As células mesenquimais não se desenvolverem conforme previsto.	Técnico	Tamanho de poros não adequado da matriz cerâmica e não interação das células com o material.	Risco Baixo	Utilizar de protocolos já implementados na literatura	Vasta revisão bibliográfica	Reuniões periódicas de acompanhamento de resultados
II	O material não apresentar relação resistência mecânica /porosidade prevista	Técnico	Não identificação correta da relação de parâmetros (temperatura de sinterização, concentração de sólidos, concentração de solutos, etc.) que permita produção do suporte cerâmico com relação resistência mecânica/porosidade ideal.	Risco Médio	Utilizar de protocolos já implementados na literatura	Vasta revisão bibliográfica	Reuniões periódicas de acompanhamento de resultados
III	Integrantes do grupo envolvidos no projeto, por força maior, desistirem ou se ausentarem por extenso período.	Externo	Devido a alta qualificação dos integrantes do grupo, existe a possibilidade de oferta de melhores oportunidades por empresas privadas ou setores públicos diversos. Há o fato de as bolsas não terem um valor tão atrativo. Além disso, os integrantes estão sujeitos a problemas de saúde.	Risco Elevado	Promover bom ambiente de trabalho. Avaliar periodicamente a saúde mental dos integrantes. Oferecer infra estrutura adequada ao desenvolvimento do trabalho.	Atuar próximo e diretamente com todo o grupo que esteja sob minha supervisão, no intuito de promover eficientemente as ações descritas no item "Descrição dos procedimentos de minimização".	Reuniões periódicas de acompanhamento.
IV	O câmbio pode afetar o valor de compra dos equipamentos essenciais ao desenvolvimento da pesquisa.	Externo	Volatilidades naturais de mercado que façam o real se desvalorizar principalmente frente ao Euro e ao Dólar.	Risco Elevado	Não há ação possível de ser tomada para prevenir possíveis volatilidades.	Não há ação possível de ser tomada para prevenir possíveis volatilidades.	Acompanhar o mercado externo e a volatilização monetária.
V	Demora devido a burocracia no trâmite de importação de equipamentos.	Externo/Gerenciamento de projeto	Os equipamentos em sua grande maioria são importados e há necessidade de retirada na alfândega. Há possível atraso no próprio trâmite interno na UnB.	Risco Moderado	Realizar os processos de compra e importação dentro das normas padrões para que não haja atraso no trâmite processual.	Demonstrar a necessidade e requerer das autoridades responsáveis pelos trâmites que seja cumprido os prazos estipulados	Ter conhecimento dos prazos legais e acompanhar junto aos responsáveis pelos trâmites para que seja minimizado o risco de atraso no processo.

VI	Atraso na autorização dos comitês de ética.	Organizacional	O comitê de ética identificar alguma inconsistência no pedido.	Risco Baixo	Ter pleno conhecimento dos requisitos para solicitação ao comitê de ética e seguir estritamente as regras.	Conhecer em detalhes os requisitos para solicitação ao comitê de ética.	Acompanhamento do processo de autorização do comitê de ética e correção imediata de possíveis imprecisões do processo.
VII	Não desenvolvimento do material	Gerenciamento de projetos/Técnico	A matriz cerâmica não possuir tamanho de poros e resistência mecânica ideal, além do fato das células não se adaptarem ao meio.	Risco Moderado	Utilizar de protocolos já implementados na literatura	Vasta revisão bibliográfica	Reuniões periódicas de acompanhamento de resultados

