



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1010619-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1010619-7

(22) Data do Depósito: 04/06/2010

(43) Data da Publicação do Pedido: 09/12/2010

(51) Classificação Internacional: A61L 27/38.

(30) Prioridade Unionista: EP 09161976.7 de 04/06/2009.

(54) Título: BIOMATERIAL MULTIDIMENSIONAL E MÉTODO PARA SUA PRODUÇÃO

(73) Titular: UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN. Endereço: Place de L' Université 1 Louvain-La- Neuve Be, BÉLGICA(BE); CLINIQUES UNIVERSITAIRES SAINT-LUC. Endereço: Avenue Hippocrate 10, B-1200 Bruxelles, BÉLGICA(BE)

(72) Inventor: DENIS DUFRANE; CHRISTIAN DELLOYE.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 04/06/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 13/11/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**BIOMATERI-
AL MULTIDIMENSIONAL E MÉTODO PARA SUA PRODUÇÃO**".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo de células-tronco me-
5 senquimais e a diferenciação destas para produção de tecidos ou biomateri-
ais ou matrizes multidimensionais. Os produtos da invenção são úteis para
reumatologia, para reconstrução de tecidos e/ou cirurgia, principalmente em
traumatologia, cirurgias ortopédicas, plásticas ou maxilofaciais. Especial-
mente, os produtos da invenção podem ser úteis em reparo ou reposição de
10 osso ou cartilagem.

Antecedentes da invenção

A construção de tecidos é um campo em crescimento, em que
novos materiais estão sendo desenvolvidos para implantação no corpo. Uma
área importante envolve materiais para enxertia óssea, visando repor áreas
15 de perda óssea causada por trauma ou doença (como, por exemplo, ressec-
ção tumoral). Tradicionalmente, o material enxertado pode ser recolhido do
osso do indivíduo no qual o material será enxertado. Entretanto, para esse
procedimento, são necessárias cirurgia e recuperação adicionais. O material
ósseo pode ser retirado de outras pessoas, ou mesmo de cadáveres, porém
20 com isso são introduzidas questões relativas à biocompatibilidade, bem co-
mo o risco de transmissão de doenças.

O campo da diferenciação de células-tronco tem sido objeto de
pesquisas que visam produção de tecidos. Por exemplo, o documento
WO2007/103442 descreve uma composição compreendendo um *scaffold*
25 (arcabouço, material de suporte) de seda e células-tronco de adultos, em
que as referidas células-tronco de adulto são células-tronco derivadas de
tecido adiposo.

Questão técnica

No entanto, a produção de tecidos multidimensionais para uso
30 em enxertia óssea, reforço ósseo ou reconstrução óssea ainda permanece
uma questão técnica real. A mesma questão continua existindo também na
reconstrução de cartilagem ou para atenuação de defeitos na cartilagem.

Existe ainda, portanto, necessidade no estado da técnica de materiais construídos com tecidos que sejam completamente biocompatíveis e ofereçam as características mecânicas apropriadas para as aplicações destinadas.

5 Sumário da invenção

A presente invenção refere-se a um biomaterial osteoindutor humano natural, tendo estrutura multidimensional e consistindo em tecido formado por células-tronco mesenquimais (MSCs) diferenciadas e em matriz óssea desmineralizada (DBM), em que a referida matriz óssea desmineralizada está dispersa dentro do tecido de MSCs diferenciadas.

A MSC utilizada para formar o tecido de MSCs diferenciadas pode ser de origem humana ou animal.

De acordo com uma primeira concretização, as MSCs foram isoladas de tecido adiposo e são, a seguir, designadas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AMSCs).

De acordo com outra concretização, as MSCs foram isoladas de medula óssea e são, a seguir, designadas células-tronco derivadas de medula óssea (BMSCs). De preferência, as MSCs incluídas no biomaterial da invenção são células-tronco derivadas de tecido adiposo, obtidas em passagem mais avançada.

O biomaterial da invenção destina-se a ser implantado em corpo humano ou animal. O biomaterial implantado pode ser de origem autóloga ou alogênica. O biomaterial da invenção permite ser implantado em área óssea ou cartilaginosa. O biomaterial da invenção pode ser implantado em áreas irregulares do corpo humano ou animal.

O biomaterial da invenção é biocompatível.

Tipicamente, o biomaterial da invenção é homogêneo, o que significa que a estrutura e/ou a constituição do biomaterial são semelhantes em toda a extensão do tecido. Tipicamente, o biomaterial da invenção possui características desejáveis de manuseio e mecânicas, necessárias para implantação na área doente original.

De acordo com uma concretização específica, o biomaterial da

invenção pode ser segurado com instrumento cirúrgico sem que se rompa.

Em uma concretização da invenção, o biomaterial não inclui agentes de coesividade ou agente aglutinante.

De acordo com uma concretização preferida, o biomaterial de acordo com a invenção é tridimensional. Nesta concretização, o biomaterial da invenção pode formar uma película grossa com espessura de pelo menos 1 mm. O tamanho do biomaterial pode ser ajustado conforme conveniente para o uso. Em outra concretização, o biomaterial forma um *scaffold*: sendo assim, o biomaterial da invenção não necessita o uso de qualquer outro suporte sintético adicional.

De acordo com outra concretização, o biomaterial da invenção pode formar uma película fina de menos de 1 mm. Nesta concretização, o biomaterial é dito bidimensional.

De acordo com uma primeira concretização, o biomaterial da invenção possui as mesmas propriedades que um osso real com expressão de osteocalcina e propriedades de mineralização, ou seja, é constituído por células ósseas e tecido interconectivo. De acordo com uma concretização específica, o biomaterial da invenção é composto por células ósseas (denominadas também células tipo osteócito) e colágeno, de preferência colágeno calcificado e mineralizado, uma matriz óssea e um revestimento mineral sobre as células ósseas, o revestimento sendo de cristais fosfocálcicos organizados. Tipicamente, a porosidade do biomaterial da invenção é próxima à do osso natural.

De acordo com uma segunda concretização, o biomaterial da invenção possui as mesmas propriedades que cartilagem real, ou seja, é composto por condrócitos, uma matriz extracelular compreendendo colágeno e proteoglicanos.

As propriedades de recolonização do biomaterial da invenção podem depender do meio no qual o biomaterial é implantando: o biomaterial da invenção pode permitir nova colonização quando inserido em ambiente ósseo e pode não permitir nova colonização quando inserido em ambiente diferente do ósseo.

O biomaterial da invenção é tal, que se a diferenciação das células do biomaterial atingir um desfecho, o fenótipo do biomaterial permanecerá inalterado quando implantado. O implante da invenção pode ser em multicamada, ou seja, compreender pelo menos duas camadas de biomaterial, possivelmente suturadas e fixas entre si por qualquer meio adequado, como, por exemplo, cola cirúrgica ou quaisquer meios adequados de fixação.

Tipicamente, o biomaterial da invenção inclui uma matriz óssea desmineralizada na forma de partículas com diâmetro médio de 50 – 2500 μm ; em uma primeira concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 50 – 125 μm ; em uma segunda concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 125 – 200 μm ; em uma terceira concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 500 – 1000 μm . Tipicamente, a matriz óssea desmineralizada é obtida de doadores com menos de 40 anos de idade. De acordo com uma concretização, a taxa de desmineralização da matriz óssea é de 90 – 99%, de preferência 95 – 98% e, ainda mais preferivelmente, em torno de 97%. Esta taxa de desmineralização resulta vantajosamente de um processo usando HCl 0,6 N durante 3 horas. De acordo com uma concretização específica, a matriz óssea desmineralizada é esterilizada.

De acordo com uma concretização específica, a matriz óssea desmineralizada é fornecida pelo *University Tissue Bank* (Cliniques universitaires Saint-Luc, Bruxelas, Bélgica).

Esta invenção refere-se também a um método para produzir um biomaterial, compreendendo incubar MSCs em meio osteoblástico e/ou condrogênico por 15 a 25 dias e, em seguida, adicionar matriz óssea desmineralizada ao referido meio e manter a incubação por um período adicional de 15 a 30 dias, de preferência de 15 a 25 dias, mais preferivelmente de 20 dias; durante o período adicional, de preferência, substituir o meio a cada 2 dias sem que a matriz óssea desmineralizada seja retirada.

Incubar MSCs antes de adicionar matriz óssea desmineralizada é uma etapa fundamental do método da invenção. Tal etapa é necessária para permitir a diferenciação das MSCs em células condrogênicas e/ou células osteoblásticas. Adicionalmente, esta etapa é necessária para ser obtida

uma estrutura tridimensional semelhante à óssea.

De acordo com uma concretização preferida, a MSC é do tipo células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, obtidas em passagem avançada.

5 De acordo com uma concretização, 1 a 20 mg de matiz óssea desmineralizada por mL de meio são adicionados. De acordo com uma concretização preferida, 1 a 10 mg de matriz óssea desmineralizada por mL de meio são adicionados.

10 O mais preferível é de 5 a 10 mg de matriz óssea desmineralizada por mL de meio serem adicionados. A referida quantidade de matriz óssea desmineralizada é a concentração ideal para conferir ao biomaterial estrutura tridimensional semelhante à óssea.

De acordo com uma concretização, todos os meios estão livres de proteínas animais.

15 De acordo com uma segunda concretização, o meio de diferenciação contém soro humano. Vantajosamente, o meio de diferenciação não contém soro animal, de preferência, o meio só contém soro humano.

20 A invenção refere-se também a um biomaterial multidimensional a ser obtido pelo método de acordo com a invenção. O biomaterial a ser obtido pelo método da invenção destina-se a ser implantado em corpo humano ou animal. O biomaterial implantado pode ser de origem autóloga ou alogênica. O biomaterial da invenção permite ser implantado em área óssea ou cartilaginosa. Este biomaterial pode ser implantado em áreas irregulares do corpo humano ou animal.

25 O biomaterial a ser obtido pelo método da invenção é biocompatível.

30 Este biomaterial é homogêneo, o que significa que a estrutura e/ou a constituição do biomaterial são semelhantes por toda a extensão do tecido inteiro. De preferência, este biomaterial possui características desejáveis de manuseio e mecânicas, necessárias para implantação na área doente original. Tipicamente, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção pode ser segurado com instrumento cirúrgico sem que se rompa.

Em uma concretização da invenção, o biomaterial não inclui agentes de coesividade ou agentes aglutinantes.

Em outra concretização, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção é tridimensional. Nesta concretização, o biomaterial da invenção
5 pode formar uma película grossa com espessura de pelo menos 1 mm. O tamanho do biomaterial pode ser ajustado conforme conveniente para o uso. Em outra concretização, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção forma um *scaffold*: sendo assim, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção não necessita o uso de qualquer outro suporte sintético adicional.

10 Em ainda outra concretização, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção pode formar uma película fina de menos de 1 mm. Nesta concretização, o biomaterial é bidimensional.

De acordo com uma primeira concretização, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção possui as mesmas propriedades que um
15 osso real com respeito à expressão de osteocalcina e propriedade de mineralização, ou seja, é constituído por células ósseas e tecido interconectivo. Em uma concretização, este biomaterial é composto por células ósseas (denominadas também células tipo osteócito) e colágeno, de preferência colágeno calcificado e mineralizado, uma matriz óssea e um revestimento mine-
20 ral sobre as células ósseas, o revestimento sendo de cristais fosfocálcicos organizados. Tipicamente, a porosidade do biomaterial da invenção é próxima à do osso natural.

De acordo com uma segunda concretização, o biomaterial a ser obtido pelo método da invenção possui as mesmas propriedades que carti-
25 lagem real, ou seja, é composto por condrócitos, uma matriz extracelular compreendendo colágeno e proteoglicanos.

O biomaterial a ser obtido pelo método da invenção é tal que, se a diferenciação das células do biomaterial atingir um desfecho, o fenótipo do biomaterial permanecerá inalterado quando implantado. O implante da in-
30 venção pode ser em multicamada, ou seja, compreender pelo menos duas camadas de biomaterial, possivelmente suturadas e fixas entre si por qualquer meio adequado, como, por exemplo, cola cirúrgica ou quaisquer meios

adequados de fixação.

O biomaterial a ser obtido pelo método da invenção inclui uma matriz óssea desmineralizada na forma de partículas com diâmetro médio de 50 – 2500 μm ; em uma primeira concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 50 – 125 μm ; em uma segunda concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 125 – 200 μm ; em uma primeira concretização, as partículas possuem diâmetro médio de 500 – 1000 μm . Tipicamente, a matriz óssea desmineralizada é obtida de doadores com menos de 40 anos de idade. De acordo com uma concretização, a taxa de desmineralização da matriz óssea é de 90 – 99%, de preferência 95 – 98% e, ainda mais preferivelmente, em torno de 97%. Esta taxa de desmineralização resulta vantajosamente de um processo usando HCl 0,6 N durante 3 horas. De acordo com uma concretização específica, a matriz óssea desmineralizada é esterilizada.

Tipicamente, a matriz óssea desmineralizada é fornecida pelo *University Tissue Bank* (Cliniques universitaires Saint-Luc, Bruxelas, Bélgica).

A invenção refere-se a qualquer uso do biomaterial da invenção, na forma de dispositivo médico ou incluído em um dispositivo médico ou em uma composição farmacêutica.

A invenção refere-se também a um kit, incluindo um dispositivo médico, contendo o biomaterial da invenção, e um meio adequado de fixação como, por exemplo, cola cirúrgica ou cola tecidual ou qualquer composição adesiva que seja biocompatível, não tóxica para uso cirúrgico, possivelmente biorreabsorvível e, especificamente, para unir tecidos biológicos entre si ou a um biomaterial implantado.

A invenção refere-se adicionalmente a um kit, compreendendo o biomaterial da invenção e um meio adequado de fixação como, por exemplo, cola cirúrgica ou cola tecidual ou qualquer composição adesiva que seja biocompatível, não tóxica para uso cirúrgico, possivelmente biorreabsorvível e, especificamente, para unir tecidos biológicos entre si ou a um biomaterial implantado.

Em outro aspecto, a invenção refere-se ao biomaterial de acordo

com a invenção para modo de uso em atenuar ou tratar um defeito ósseo ou cartilaginoso.

5 A invenção refere-se também a um método para atenuar ou tratar um defeito ósseo ou cartilaginoso em mamífero, o referido método compreendendo administrar ao referido mamífero com defeito ósseo ou cartilaginoso uma quantidade terapêuticamente eficaz de um biomaterial conforme descrito neste relatório.

O biomaterial é usado em quantidade terapêuticamente eficaz para atenuar ou tratar um defeito ósseo ou cartilaginoso em mamífero.

10 Entre os exemplos de defeito ósseo ou cartilaginoso encontram-se fratura óssea, fragilidade óssea, perda de densidade mineral óssea, artrite, osteoporose, osteomalácia, osteopenia, câncer ósseo, doença de Paget, lesões escleróticas, transtornos causados por infiltração óssea, perda óssea metabólica.

15 A invenção refere-se também ao uso do biomaterial em ortopedia, especialmente, em cirurgia maxilofacial ou plástica. O biomaterial da invenção pode ser usado também em reumatologia.

20 A invenção refere-se ainda a um método para usar o biomaterial da invenção para suporte ou correção de anormalidades congênitas ou adquiridas das articulações, dos ossos craniofaciais e maxilares, procedimentos ortodônticos, reposição óssea ou osteoarticular após cirurgia, trauma ou outras anormalidades congênitas ou adquiridas e para sustentação de outros implantes musculoesqueléticos, especialmente implantes artificiais e sintéticos.

25 Em outro aspecto, a invenção refere-se ao uso do biomaterial da invenção para preencher uma cavidade óssea no corpo humano ou animal.

30 Em ainda outro aspecto, a invenção refere-se ao uso do biomaterial da invenção para cirurgia reconstrutora ou estética. O biomaterial da invenção pode ser autólogo ou alogênico. O biomaterial pode ser usado em enxertia de tecido.

A invenção refere-se ainda a um método para preencher uma cavidade dentro do corpo humano ou animal, o referido método compreen-

dendo a etapa de administrar o biomaterial da invenção.

O biomaterial da invenção pode ser usado como implante alogênico ou como implante autólogo.

O biomaterial é vantajoso também pelo fato de não ser imunogênico e por ter efeito imunomodulador: surpreendentemente, no biomaterial da invenção, as propriedades imunomoduladoras de MSC indiferenciadas são retidas, fazendo com que a implantação do biomaterial da invenção dentro do corpo humano ou animal não resulte no aparecimento de reação inflamatória; pelo contrário, a presença do biomaterial atenua a inflamação no sítio de implantação.

O biomaterial da invenção é, portanto, especialmente adequado para o tratamento de artrite, especialmente de artrite inflamatória, como alternativa a substâncias farmacêuticas anti-inflamatórias como recurso para reduzir a quantidade de substâncias anti-inflamatórias necessitadas por um paciente que sofre as consequências da referida inflamação.

O biomaterial da invenção é adicionalmente vantajoso por estimular a angiogênese. De fato, as MSCs do biomaterial liberam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos. Tal aspecto da invenção é altamente promissor, uma vez que oferece condições ideais para formação óssea ou de cartilagem.

Definições

No contexto desta invenção, o termo “tecido” refere-se a uma coleção de células interligadas que desempenham função semelhante dentro de um tecido humano nativo.

No contexto desta invenção, o termo “células-tronco mesenquimais” ou MSCs são células-tronco pluripotentes capazes de se diferenciarem em uma variedade de tipos celulares.

“Tecido adiposo” refere-se a qualquer tecido contendo gordura. O tecido adiposo pode ser tecido adiposo marrom, amarelo ou branco. De preferência, o tecido adiposo é tecido adiposo branco subcutâneo. O tecido adiposo inclui adipócitos e estroma. O tecido adiposo pode ser encontrado por todo o corpo de um animal. Por exemplo, em mamíferos, o tecido adipo-

so está presente no omento, medula óssea, espaço subcutâneo, coxins adiposos (por exemplo, coxim adiposo escapular ou infrapatelar) e circundando a maioria dos órgãos. Células obtidas de tecido adiposo podem compreender cultura de células primárias ou linhagem de célula progenitora. O tecido adiposo pode ser proveniente de qualquer organismo tendo tecido gorduroso.

O termo “célula derivada de tecido adiposo” refere-se a uma célula com origem no tecido adiposo. A população celular inicial isolada do tecido adiposo é formada por células heterogêneas incluindo, entre outras, a fração celular do estroma vascular (SVF).

Neste relatório descritivo, o termo “células-tronco mesenquimais do tecido adiposo” (AMSCs) refere-se a células estromais com origem no tecido adiposo e que são capazes de servir como precursoras para uma variedade de diferentes tipos celulares tais como, entre outras, adipócitos, osteócitos, condrócitos.

Neste relatório descritivo, a expressão “células-tronco mesenquimais do tecido nervoso, obtidas em passagem avançada” refere-se a uma célula exibindo menos característica imunogênica quando comparada a outra obtida em passagens mais precoces. A imunogenicidade de uma célula estromal derivada de tecido de adiposo corresponde ao número de passagens. De preferência, a célula foi obtida após pelo menos a quarta passagem, mais preferivelmente, até pelo menos a sexta passagem e, o mais preferível, a célula foi obtida após pelo menos a oitava passagem.

Neste relatório descritivo, “biocompatível” refere-se a qualquer material que, quando implantado em mamífero, não provoca resposta adversa no mamífero. Um material biocompatível, quando introduzido em um indivíduo, não é tóxico ou prejudicial ao indivíduo, nem induz rejeição imunológica do material no mamífero.

Neste relatório descritivo, “autólogo” refere-se a um material biológico derivado do mesmo indivíduo em quem o material será reintroduzido mais tarde.

Neste relatório descritivo “alogênico” refere-se a um material bio-

lógico derivado de um indivíduo geneticamente diferente da mesma espécie que o indivíduo em quem o material será reintroduzido.

Neste relatório descritivo, "enxerto" refere-se a uma célula, tecido ou órgão que é implantado em um indivíduo, tipicamente para substituir, corrigir ou de outra forma superar um defeito. O tecido ou órgão pode ser constituído por células que são originárias do mesmo indivíduo; este enxerto é designado neste relatório descritivo pelos seguintes termos alternáveis: "autoenxerto", "transplante autólogo", "implante autólogo" e "enxerto autólogo". Um enxerto compreendendo células de um indivíduo geneticamente diferente da mesma espécie é designado neste relatório descritivo pelos seguintes termos alternáveis: "aloenxerto", "transplante alogênico", "implante alogênico" e "enxerto alogênico". Um enxerto de um indivíduo para seu gêmeo idêntico é designado neste relatório descritivo "isoenxerto", "transplante singênico", "implante singênico" ou "enxerto singênico". "xenoenxerto", "transplante xenogênico" ou "implante xenogênico" refere-se a um enxerto de um indivíduo para outro de espécie diferente.

Neste relatório descritivo, os termos "enxertia tecidual" e "reconstrução tecidual" referem-se ambos a implantar um enxerto em um indivíduo para tratar ou atenuar um defeito tecidual, tal como, por exemplo, defeito ósseo ou defeito cartilaginoso.

Neste relatório descritivo, "atenuar" uma doença, defeito, transtorno ou condição significa reduzir a gravidade de um ou mais sintomas da doença, do defeito, do transtorno ou da condição.

Neste relatório descritivo, "tratar" significa reduzir a frequência com que sintomas de uma doença, defeito, transtorno ou condição adversa, e os semelhantes, são vivenciados por um paciente.

Neste relatório descritivo, "quantidade terapêuticamente eficaz" é a quantidade de uma composição da invenção suficiente para proporcionar um efeito benéfico ao indivíduo ao qual a composição é administrada.

Neste relatório descritivo, "defeito ósseo" refere-se a osso quebrado, fraturado, com perda de partes ou de outra forma danificado. Tal dano pode ser decorrente de anomalia congênita, doença, tratamento de doen-

ça, trauma ou infecção óssea, e pode ser agudo ou crônico. Por exemplo, perda óssea pode ocorrer em consequência à ressecção tumoral, resultando com isso em defeito ósseo. Entre os exemplos de defeitos ósseos encontram-se: fraturas ósseas, deformação óssea/coluna vertebral, osteossarcoma, mieloma, displasia óssea, escoliose, osteoporose, osteomalácia, raquitismo, osteíte fibrosa, displasia fibrosa, distrofia óssea renal e doença óssea de Paget.

Neste relatório descritivo, “defeito cartilaginoso” refere-se à perda, quantidade reduzida ou de outra forma dano ao tecido cartilaginoso. Um defeito de tecido cartilaginoso pode resultar de anomalia congênita, doença, tratamento de doença ou trauma, e pode ser agudo ou crônico (osteoartrite).

Neste relatório descritivo, o termo “meio osteoblástico e/ou condrogênico” é usado para se referir a um meio de cultura que promove o crescimento e a diferenciação de células osteoblásticas e/ou condrogênicas.

Vantajosamente, a osteogênese é induzida suplementando-se um meio padrão com soro humano ou animal (de preferência soro bovino fetal ou adulto (FCS, FBS)), dexametasona, ascorbato de sódio, di-hidrofosfato de sódio, penicilina e estreptomicina. As células são mantidas em cultura osteogênica com meio substituído a cada dois dias.

Em uma concretização preferida, o meio osteoblástico é um meio padrão, de preferência DMEM, suplementado com 10% v/v de soro humano, dexametasona a 1 μ M, 50 μ g/mL de ascorbato de sódio, 36 mg/mL de di-hidrofosfato de sódio, 10 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina.

A condrogênese é vantajosamente induzida suplementando-se um meio padrão com soro humano ou animal (de preferência soro bovino fetal ou adulto (FCS, FBS)), dexametasona, TGF-B3, L-prolina, ascorbato de sódio, di-hidrofosfato de sódio, piruvato de sódio, ITS (Insulina-Transferrina-Selênio, por exemplo, a partir do suplemento de meio em pó liofilizado contendo insulina-transferrina-seleneto de sódio, disponibilizado pela Sigma), penicilina e estreptomicina.

Um meio condrogênico preferido é um meio padrão, de prefe-

rência DMEM, suplementado com 10% v/v de soro humano, dexametasona a 1 μ M, 10 ng de TGF-B3, 40 μ g/mL de L-prolina, 50 μ g/mL de ascorbato de sódio, 36 mg/mL de di-hidrofosfato de sódio, 100 μ g/mL de piruvato de sódio, 100 μ g/mL de ITS (Insulina-Transferrina-Selênio, por exemplo, a partir
5 do suplemento de meio em pó liofilizado contendo insulina-transferrina-seleneto de sódio, disponibilizado pela Sigma), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina.

O meio padrão adequado tanto para o meio osteogênico, como para o condrogênico inclui, entre outros, DMEM, EMEM, RPMI e GMEM,
10 sendo DMEM o meio padrão preferido.

Neste relatório descritivo, “*scaffold*” refere-se a uma estrutura de suporte, incluindo na forma de, entre outras, películas (por exemplo, forma com duas dimensões substancialmente maiores do que a terceira dimensão), fitas, cordões, fitas, discos planos, cilindros, esferas, formas amorfas
15 tridimensionais, etc.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 mostra a diferenciação de AMSCs humanas em meio osteogênico suplementado com soro humano e DBM. Uma estrutura multicamada (A) com retração tecidual e contendo tecido interconectivo (B) foi
20 descoberta por coloração com corante Tricrômico de Masson (C).

A Figura 2 mostra a diferenciação de AMSCs em meio condrogênico sem (A, B) e com (C, D, E) DBM. Uma estrutura monocamada (A) com célula confluyente desenvolveu-se no meio condrogênico sem DMB (B). Em contraste, uma estrutura multicamada (C), obtida por retração do tecido
25 celular (D), foi composta por matriz semelhante à condrogênica corada por azul de Alcian (E e retângulo com coloração pelo Giemsa).

A Figura 3 mostra a diferenciação de AMSCs humanas em meio osteogênico sem (A, B, C) e com (D, E, F) DBM. Uma estrutura monocamada (A), feita de nódulos ósseos individuais (coloração com vermelho de Alizarin, B) e tecido de colágeno entre os nódulos, foi desenvolvida no meio
30 osteogênico sem DBM. Em contraste, retração de tecido celular (D) com tecido interconectivo (E) feito de colágeno mineralizado (F, coloração de Von

Kossa em preto; retângulo à esquerda) com células expressando osteocalcina (F, retângulo à direita).

A Figura 4 mostra que a viabilidade de BM-MSCs e de AMSCs alteram 60 dias após a implantação em músculos paravertebrais de ratos *nude*. Células-tronco mesenquimais foram detectadas por imunohistoquímica para GFP e anticorpo contra osteocalcina. Na implantação apenas de osso, não foram encontradas células coradas com expressão de GFP e osteocalcina. Nos enxertos compostos, feitos de “enxerto de MSC-osso humano”, foram detectadas células com GFP e osteocalcina.

A Figura 5 mostra o desenvolvimento de estruturas multidimensionais para AMSCs incubadas em meio osteogênico (A – C) e condrogênico (E – F), suplementado com DBM. Retração tecidual (A, D), interconexão de DBM (B, E) e expressão proteica de osteocalcina[©] e proteoglicanos (F).

A Figura 6 mostra o potencial angiogênico de AMSCs em comparação a BM-MSCs. Potencial *in vitro* foi constatado por incubação de ambas as células a diferentes concentrações de oxigênio (0,1; 3; 5 e 21% de O₂). AMSCs demonstraram, em todas as concentrações de O₂, liberação de VEGF significativamente mais alta do que BM-MSCs.

Exemplos

Exemplo 1 – Preparo do biomaterial multidimensional de acordo com a invenção

Origem animal para AMSCs em modelo pré-clínico

Porcos transgênicos para fluorescente verde foram utilizados como doadores para células-tronco de medula óssea e de adipócitos (Brunetti D, *Cloning Stem Cells*, eupb 2008). Os animais foram alojados de acordo com as diretrizes do Ministério de Agricultura e Proteção a Animais da Bélgica. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local para Proteção Animal da Université catholique de Louvain.

Fonte para AMSCs de origem animal

A colagenase (0,075 g) é reconstituída em solução salina equilibrada de Hank (com íons de cálcio) e armazenada a 2 – 8 °C antes da digestão. Tecidos gordurosos (média de 15 g) foram lavados três vezes com

NaCl 0,009% e cortados em lâmina de Petri para retirada de vasos e tecido conjuntivo fibroso. A gordura é pesada antes da digestão e transferida para tubo Flacon de 50 mL contendo a enzima. O tecido é colocado em banho de água agitada a 37 °C e mantido em agitação contínua por 60 minutos. Após a digestão, a colagenase é inativada em DMEM (500 mL), suplementado com 50 mL de soro humano, L-glutamina (5 mL) e 5 mL de antibióticos (penicilina/estreptomicina). O tecido coletado é centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente (20 – 25 °C). O sobrenadante, contendo adipócitos maduros, é aspirado. O grânulo é novamente suspenso em 20 mL de meio de proliferação (MP), constituído por DMEM suplementado com soro humano 10% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), e filtrado através de uma tela *mesh* de 500 µm. O tecido coletado (após a filtração) é centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm a 1500 rpm à temperatura ambiente (20 – 25 °C) e o grânulo é novamente suspenso no MP e identificado como a fração celular de estroma vascular (SVF). Essa passagem inicial das células primárias foi designada passagem 0 (P0). Após 24 – 48 horas de incubação a 37 °C em CO₂ 5%, as culturas foram lavadas com PBS e mantidas no MP até P4 (quarta passagem) e diferenciadas então em meios específicos (vide abaixo).

20 Fonte para AMSCs de origem humana

Tecido adiposo humano (cortes pequenos de tecido gorduroso subcutâneo, 1 – 2 g, n = 4) foi retirado durante cirurgia de rotina (cirurgia abdominal e ortopédica), conservado em solução fisiológica gelada a 4 °C até chegar ao laboratório para processamento. A digestão do tecido adiposo humano foi processada conforme previamente descrito para o processamento do tecido adiposo suíno. Após a digestão, AMSCs humanas foram cultivadas em MP e diferenciadas em meios específicos (vide abaixo para composição exata), suplementado com (i) soro bovino fetal (10% v/v) ou (ii) soro humano (10% v/v).

30 Foi observado que as AMSCs diferenciaram-se nos dois meios de diferenciação contendo FBS e nos meios de diferenciação contendo soro humano.

Fonte para matriz óssea desmineralizada

A matriz óssea desmineralizada humana foi fornecida pelo University Tissue Bank (Cliniques universitaires Saint-Luc, Bruxelas, Bélgica), e produzidas a partir de doadores humanos de múltiplos órgãos. A diáfise do osso femoral ou tibial é cortada e pesada em partículas com menos de 1000 μm para tratamento de desmineralização (vide abaixo).

A DBM humana é obtida moendo-se ossos corticais de doadores humanos selecionados. Primeiramente, o tecido ósseo humano é separado do tecido adiposo por banho com acetona (99%) durante a noite e seguido por lavagem em água desmineralizada durante 2 horas. A descalcificação é realizada pela imersão em HCl 0,6 N durante 3 horas (20 mL de solução por grama de osso) em agitação à temperatura ambiente. Em seguida, o osso desmineralizado em pó é lavado com água desmineralizada durante 2 horas e o pH é controlado. Se o pH estiver demasiadamente ácido, a DMB é tamporada com solução de fosfato a 0,1 M em agitação. Finalmente, a DBM é seca e pesada. A DBM é esterilizada por irradiação gama a 25 kGray em temperatura congelada.

Diferenciação e caracterização de células-tronco

Adipogênese

Culturas confluentes de AMSCs foram induzidas para sofrerem adipogênese, substituindo o MP por meio de indução de adipócitos, composto pelo meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado com soro humano 20%, L-glutamina (5 mL), insulina bovina (5 $\mu\text{g/mL}$), indometacina (50 μM), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX, 0,5 mM), dexametasona (1 μM) e penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ (Mauney JR, *Biomaterials* 2005, vol. 26: 6167). As células foram mantidas em cultura adipogênica com meio substituído a cada 2 dias. As culturas foram lavadas com PBS e fixadas em solução de formol, e a diferenciação foi determinada por coloração de lipídios neutros com óleo vermelho.

Osteogênese

Culturas confluentes de AMSCs foram induzidas para sofrerem osteogênese usando um meio osteogênico obtido pela suplementação de

DMEM com soro humano (10% v/v), dexametasona (1 μ M), ascorbato de sódio (50 μ g/mL), di-hidrofosfato de sódio (36 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (vide a Figura 3-A, B, C). As células foram mantidas em cultura osteogênica com meio substituído a cada 2 dias. As

5 culturas foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70%, e a diferenciação osteogênica foi determinada por coloração para fosfato de cálcio com vermelho de Alizarin. Adicionalmente, análises por imunohistoquímica com colorações para osteocalcina e de von Kossa foram realizadas para confirmar o fenótipo de "osso" (vide a Figura 4).

10 Condrogênese

Culturas confluentes de AMSCs foram induzidas para sofrerem condrogênese usando um meio condrogênico obtido pela suplementação de DMEM com soro humano (10% v/v), dexametasona (1 μ M), TGF-B3 (36 ng/mL), L-prolina (40 μ g/mL), ascorbato de sódio (50 μ g/mL), di-hidrofosfato

15 de sódio (36 mg/mL), piruvato de sódio (100 μ g/mL), ITS (Insulina-Transferrina-Selênio, por exemplo, proveniente de suplemento de meio em pó liofilizado contendo insulina-transferrina-selenito de sódio disponibilizado pela Sigma) (100 μ g/mL), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (Taipaleenmäki H, *Experimental Cell Research* 2008, vol. 314: 2400).

20 As células foram mantidas em cultura condrogênica com meio substituído a cada 2 dias.

Impacto de crescimento dos meios de diferenciação (osteogênico e condrogênico sobre AMSCs)

Células e condições de cultura.

25 AMSCs foram cultivadas em meio de proliferação (MP) e mantidas a 37 °C (ar 95% e CO₂ 5%) até ser obtido em torno de 95 – 90% de confluência. O meio foi trocado a cada 2 dias. A fim de suspender as células para ensaio de citotoxicidade, as células foram destacadas do tubo de cultura com mistura de tripsina 0,25%-EDTA por 10 minutos a 37 °C e novamente

30 suspensas no meio de cultura. As células foram semeadas em microplacas de 96 cavidades para ensaio de MTS (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio) em densidade de 1×10^4

células/cavidade. O cultivo prosseguiu até próximo da confluência em 96 horas a 37 °C antes de exposição a diferentes meios testados: (i) MP, (ii) meio osteogênico e (III) meio condrogênico por 5 dias.

Ensaio de MTS. Depois de 24 horas de contato de células com
5 extrato, 20 µL de solução “Cell titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega, Madison, WI) foram adicionados diretamente a cada cavidade, contendo 100 µL de meio de extrato. As células foram incubadas por 3 horas a 37 °C. A absorvência foi medida a 492 nm usando espectrômetro de placa de microtitulação (Multiskan Ex, Labsystems, Bruxelas, Bél-
10 gica). O comprimento de onda de referência era de 690 nm. A diferença de densidade óptica, $OD = OD_{492\text{ nm}} - OD_{690\text{ nm}}$ foi estimada.

Foi observado que a diferenciação ocorria somente quando eram usados meios de diferenciação específica.

Desenvolvimento de estrutura multidimensional

15 Depois de 15 a 20 dias de incubação de AMSC (Passagem 4 da subcultura) em meios específicos (osteogênico ou condrogênico), matriz óssea desmineralizada (DBM) foi suplementada aos meios osteogênico e condrogênico, resultando em uma estrutura multidimensional (1 mg de DBM/mL de meios diferenciados) por um período adicional de 20 dias. Os meios são
20 substituídos a cada 2 dias sem retirada de DBM.

Ao final da diferenciação, as culturas foram lavadas com PBS e fixadas em solução de formol para caracterização óssea e condrogênica por histologia para osteocalcina e colorações com azul de Alcian e Giemsa (Figura 2-C, D, E, Figura 3-D, E, F).

25 Grânulos celulares foram fixados em paraformaldeído 4% durante a noite. Cortes seriados (5 µm de espessura) foram montados sobre lâminas de vidro com água desmineralizada, secos por 12 horas a 37 °C e processados para detecção imuno clássica ou histoquímica. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada colocando os cortes em peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,3%) por 30 minutos. Depois de lavagem em solução salina
30 tamponada Tris-Triton (TBS – 0,05 M, 0,05%, pH = 7,4), as lâminas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com soro normal de cabra

(1:10; BIOSYS, Boussens, França) e durante a noite com um anticorpo primário contra osteocalcina corada (anticorpo monoclonal de camundongo anti-osteocalcina; ABCAM, Cambridge, Reino Unido) em diluição de 1:100. Depois de lavagem com Tris-TBS, as lâminas foram incubadas por 1 hora
5 com anti-IgG secundário de camundongo para detecção de imunoperoxidase.

A estrutura de colágeno foi estudada por análise com Tricrômico de Masson sobre cada amostra para todos os tipos de células indiferenciadas/ diferenciadas. Células fibroblásticas incubadas em meio de proliferação
10 e diferenciação (osteogênico, condrogênico e adipogênico) serviram como controle negativo.

Condrócitos secretores de proteoglicano foram corados com azul de Alcian e Giemsa.

AMSCs foram coradas com quantidades saturantes de anticorpo
15 monoclonal CD90 conjugado com ficoeritrina (PE). Pelo menos 15.000 eventos foram analisados por citometria de fluxo (FACScan, BD Biosciences) com o *software* Celiquest.

Tanto no meio de diferenciação osteogênica como no de condrogênica, a DBM suplementada induziu o desenvolvimento de uma estrutura
20 tridimensional por construção celular, síntese de colágeno e reagrupamento de partículas da matriz óssea desmineralizada (vide a Figura 5 A – E). Microscopicamente, a expressão de osteocalcina e a secreção de proteoglicanos foram reveladas em condições osteogênicas (Figura 5C) e condrogênicas, respectivamente.

25 Implantação *in vivo* e análise histológica

AMSCs GFP-suína osteoblásticas diferenciadas foram semeadas sobre uma matriz óssea humana descelularizada/tratada (Dufrane D, *Eur Cell Mater*, vol. 1: 52, 2001) fornecida pelo *University Tissue Bank* (University clinical hospital Saint-Luc, Bruxelas, Bélgica). O enxerto composto foi
30 implantado por via subcutânea na região paravertebral de ratos *nude* (2 implantes/receptor e n = 10) (machos, 6 – 8 semanas de idade). Depois de 60 dias, os animais foram sacrificados e os implantes, explantados para pro-

cessamento para imunohistoquímica. Os implantes foram então descalcificados em HCl, processados e embebidos em parafina e seccionados (5 µm). Foram então realizadas análises com Tricrômico de Masson e por imunohistoquímica para osteocalcina e “Proteína Verde Fluorescente” (GFP) (anticorpo monoclonal).

Exemplo 2:

Potencial de enxerto multidimensional tipo ósseo obtido de células-tronco mesenquimais adiposas.

Materiais e métodos

10 Isolamento de AMSCs suínas e humanas

Para fins destes experimentos, o isolamento de AMSCs suínas e humanas foi realizado como descrito no Exemplo 1.

Potencial para angiogênese de AMSCs

In vitro

15 A fim de avaliar as capacidades pró-angiogênicas *in vitro* de células-tronco em condições normóxicas e hipóxicas, MSC de medula óssea suína e MSC adiposa foram colocadas em câmaras de hipóxia por 24, 48 e 72 horas a 0,1; 3; 5 e 21% de O₂, e a liberação de VEGF foi quantificada por testes pela técnica ELISA.

20 Otimização da estrutura multidimensional com matriz óssea desmineralizada

AMSCs foram induzidas para sofrerem osteogênese, suplementando-se o MP com soro fetal bovino (FBS, 10% v/v), dexametasona (1 µM), ascorbato de sódio (50 µg/mL), di-hidrofosfato de sódio, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células foram mantidas em cultura osteogênica com meio substituído a cada 2 dias (Post *et al.*, *Bone*, 43, 1: 32-39, QU *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2007; 43: 95-100). As culturas foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70%, e a diferenciação osteogênica foi determinada por coloração para fosfato de cálcio com vermelho de Alizarin. Adicionalmente, análises por imunohistoquímica com colorações para osteocalcina e de von Kossa foram realizadas para confirmar o fenótipo de "osso".

30 Uma estrutura multidimensional com AMSC foi obtida com cocultivação na presença de “Matriz Óssea Desmineralizada (DBM)”, suprida

pelo *University Tissue Bank* (University clinical hospital St-Luc, Bruxelas, Bélgica). A produção de matriz óssea desmineralizada está descrita no Exemplo 1. Fonte para Osso Desmineralizado.

Matriz

5 A eficácia da DBM é avaliada por: (i) a concentração de cálcio residual, medida depois do processo de desmineralização (>97% de redução de [cálcio]) e (ii) o potencial osteogênico *in vivo* (em ratos *nude*) em 1 mês após a implantação. Depois de incubação de AMSC (Passagem 4 da subcultura) em meio osteoblástico durante uma média de 15 - 18 dias, diferentes
10 concentrações (0/1/5/10 e 20 mg/mL) de DBM são adicionadas no meio de diferenciação específica. O médio é substituído a cada 2 dias sem retirada de DBM. O grau de estrutura 3D, a estrutura celular, a expressão de osteocalcina e coloração de Von Kossa (para depósito de cálcio) são avaliados para selecionar a concentração apropriada de DBM para estrutura tridimen-
15 sional semelhante à óssea.

Procedimento para implantação e acompanhamento de estrutura multidimensional com matriz óssea desmineralizada e AMSCs

 AMSCs obtidas de culturas osteogênicas (em 4 passagens) com concentração ideal de DBM (para estrutura multidimensional) foram coleta-
20 das para implantação.

Ratos pelados (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, Massachusetts, EUA) foram usados como receptores. As células foram implantadas nos músculos paraespinhais. Uma incisão longitudinal centrada na coluna vertebral foi realizada, e tecidos subcutâneos foram dis-
25 secados para expor a fáscia. A estrutura multidimensional foi diretamente implantada (*University Tissue Bank*, Université Catholique de Louvain, Bruxelas, Bélgica) na musculatura paravertebral. O controle foi assegurado im-plantando apenas osso esponjoso liofilizado nos músculos paraespinhais contralaterais do mesmo rato. Os animais foram sacrificados, e a elucidação
30 foi realizada em 30 dias após o transplante por meio de injeção intracardíaca de T61 (Intervet Int. GmbH-D, Alemanha) sob anestesia geral. Os implantes foram então recolhidos e processados para histologia e microtomografia

computadorizada.

Receptores suínos. Os enxertos foram testados em dois diferentes modelos cirúrgicos. Os inventores analisaram: (i) a capacidade de interligação (*bridging*) demonstrada em defeito de osso cortical femoral e (iii) o potencial de fusão exibido em fusão intervertebral lombar anterior (ALIF).

(i) O modelo de defeito em osso cortical é bem conhecido na cirurgia ortopédica experimental e no laboratório dos inventores, principalmente através do trabalho do Professor C. Delloye. Porcos são usados em modelos semelhantes, em que é criado um defeito ósseo segmentar na diáfise de um osso longo, que é então preenchido com material enxertado ou deixado vazio. No experimento dos inventores, os dois fêmures do porco são operados. Um defeito cortical de 1,5 cm é feito e estabilizado por uma placa padrão de compressão de travamento de titânio com 4,5 mm. Um defeito femoral é deixado vazio e o enxerto de AMSC é implantado na pata contralateral.

(ii) O modelo de ALIF é bem estabelecido em cirurgia experimental suína. A técnica empregada pelos inventores consiste em procedimento em quatro níveis para ALIF por abordagem póstero-lateral. A fusão é obtida por meio de cilindro de fusão intervertebral de polietilacetona (PEEK). O disco intervertebral é aberto e o núcleo pulposo removido, a fresagem da cartilagem expõe o osso subcondral e o cilindro de PEEK é então inserido. Estes cilindros são desenhados vazios, mas podem ser preenchidos com vários materiais experimentais. Neste caso, cada nível receberá um diferente tecido de enxerto, criando quatro diferentes grupos: um cilindro é deixado vazio, como o controle negativo, um segundo é preenchido com osso esponjoso liofilizado irradiado (como é frequentemente praticado no campo clínico), um terceiro contém enxerto de osso esponjoso autólogo (considerado padrão ouro em procedimento de fusão e, portanto, o controle positivo usado) e o último cilindro possui o enxerto de AMSC. Os animais foram sacrificados, e a elucidação foi realizada 7 semanas depois do transplante por meio de injeção intracardíaca de T61 (Intervet Int. GmbH-D, Alemanha) sob anestesia geral. Os implantes foram então recolhidos e processados

para histologia e tomografia computadorizada.

Acompanhamento

Ratos pelados:

Os implantes explantados foram descalcificados em HCl, processados, embebidos em parafina e seccionados (5 μm). Coloração padrão por hemalume-eosina, tricrômico verde Masson, coloração para osteocalcina e de Von Kossa foram usados para análise histológica. Osteocalcina foi corada por meio de um anticorpo monoclonal (OC4-30, Abcam, Cambridge), revelado pelo anticorpo monoclonal Envision Rsystem (Dako, Dinamarca). A microestrutura dos implantes recolhidos foi analisada usando pQCT (aparelho de tomografia computadorizada periférica quantitativa, modelo XCT Research SA, Stratec, Pforzheim, Alemanha). A densidade óssea cortical e total foi medida em múltiplas lâminas de cada implante. A quantificação de neoangiogênese *in vivo* foi realizada pela quantificação de vasos recentemente formados depois de coloração de von Willebrandt (vide acima).

Porcos:

Os porcos são alojados individualmente com acesso livre a alimentos e a água. Os cuidados e analgesia pós-operatórios são prestados seguindo protocolos padrão para cuidados com animais experimentais. No modelo de autoenxerto, o acompanhamento biológico consistirá em avaliação de inflamação por meio de amostras de sangue.

O acompanhamento radiológico permite comparar formação óssea *in vivo* por tomografia computadorizada (CT), examinada em 1, 5 e 7 semanas após a implantação. As reconstruções multiplanares e de alta resolução de exames clínicos por CT são tão precisas que é possível analisar o conteúdo dos cilindros de PEEK *in vivo*, possibilitando, dessa forma, avaliar o processo de fusão.

O mesmo procedimento é usado nos fêmures, com todas as informações reunidas através de uma única varredura dos exames. Uma resolução ainda melhor é obtida, depois do sacrifício, processando os enxertos explantados com micro-CT. As investigações histológicas e imunohistoquímicas em enxertos explantados estão em andamento para avaliar a nova

formação óssea e a revascularização do enxerto (fator de crescimento endotelial vascular, CD51, fator de von Willebrand), a consolidação (osteocalcina) e a mineralização (von Kossa), quando comparado às aptidões naturais para ligação e fusão.

- 5 O processo de descalcificação permite estudos histológicos e imunohistoquímicos do material enxertado. Histologia, histomorfometria e microrradiografia requerem manter o tecido calcificado; portanto, é obrigatório o processamento de material não descalcificado.

Estatística

- 10 A significância estatística de diferenças entre grupos foi testada por análise de variância com um fator (*one way*), usando o teste *post hoc* de Bonferroni. Os testes estatísticos foram realizados com Systat versão 8.0. As diferenças eram consideradas significantes se $p < 0,05$.

Resultados

- 15 Prova de conceito para estrutura multidimensional com concentração ideal de DBM: estrutura semelhante à óssea *in vitro*

- 20 Tendo em vista evitar o uso de suporte biológico para transplante celular de AMSC, uma estrutura multidimensional combinada a DBM foi desenvolvida. Matriz óssea desmineralizada (com diâmetro médio de 700 μm) com capacidade para promover *in vivo* diferenciação osteogênica em ratos pelados (controle de qualidade necessário antes de ser posto em contato com AMSCs) é necessária para alcançar remodelamento celular *in vitro* na coincubação com AMSCs.

- 25 Em ambos os meios de diferenciação osteogênica, a DBM suplementada induziu o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional por constrição celular, síntese de colágeno e reagrupamento de partículas da DBM, em comparação com apenas AMSCs sem DBM. Tendo em vista otimizar o desenvolvimento de estrutura multidimensional, doses graduais de DBM foram testadas. Concentrações extremas (mais de 20 mg/mL) demonstram não se adaptarem. 1 mg/mL não desenvolveu uma estrutura tridimensional ideal para manuseio de enxerto considerando aplicação cirúrgica. Em
30 contraste, 5 e 10 mg/mL demonstraram desenvolver retração tecidual ideal

para retirada de enxerto e aplicação cirúrgica. Microscopicamente, expressão de osteocalcina e processo de mineralização (coloração de Von Kossa) foram revelados com estas últimas concentrações de DBM. Um período médio de 20 ± 3 dias de incubação com DBM é necessário para obter uma estrutura tridimensional com AMSCs em condições osteogênicas.

Prova de conceito para estrutura multidimensional com concentração ideal de DBM: osteogênese *in vivo*

Ratos pelados

Depois de 30 dias da implantação em ratos nude, AMSCs isoladamente, sem DBM, não induziu a formação de uma estrutura semelhante à óssea. Somente pequenos nódulos de osso (osteocalcina⁺), corados por Von Kossa, distribuíram-se esparsamente na musculatura de ratos *nude*. Por outro lado, a estrutura multidimensional foi facilmente implantada com boa localização do sítio de implantação. Depois de 30 dias da implantação, uma estrutura compacta/ forte semelhante à óssea foi encontrada no músculo com tecido conjuntivo microscopicamente denso dentro da partícula de DBM. Uma estrutura semelhante a osso foi encontrada com tecido conjuntivo corando para osteocalcina e processo de mineralização.

Receptores suínos

Depois de 5 semanas da implantação, em porco, não foi constatada consolidação espontânea em defeito no osso femoral (sem tratamento), conforme revelado por exame por CT. Foi fácil incorporar a estrutura multidimensional no defeito ósseo sem qualquer *scaffold*. Este último enxerto melhora significativamente a consolidação óssea em período precoce pós-implantação (5 semanas após a implantação) com estrutura semelhante à óssea interligando o defeito no osso cortical nativo.

Prova de conceito para estrutura multidimensional com concentração ideal de DBM: angiogênese *in vivo*

A fim de avaliar as capacidades pró-angiogênicas *in vitro* de células-tronco em condições normóxicas e hipóxicas, MSC de medula óssea (BM) suína e MSC adiposa pré-clínicas foram colocadas em câmaras de hipóxia por 24, 48 e 72 horas a 0,1; 3; 5 e 21% de O₂, e a liberação de VEGF

foi quantificada por ELISA. BM-MSc liberou mais VEGF em condições de hipóxia do que normóxicas e manteve esta liberação no momento com os níveis mais altos de VEGF em 48 e 72 horas do que em 24 horas ($p < 0,05$). Em contraste, a liberação de VEGF de AMSc foi semelhante nas diferentes condições de cultura, porém níveis significantes mais altos de VEGF foram liberados por AMSc do que por BM-MSc (11274 ± 679 em comparação a 2364 ± 94 pg/mL, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 6).

Estes resultados foram confirmados in vivo após transplante de BM-MSc e AMSc. Angiogênese significativamente mais alta foi constatada em caso de transplante de AMScs osteogênicas em comparação a BM-MSCs ($p < 0,05$).

REIVINDICAÇÕES

1. Biomaterial, caracterizado pelo fato de que apresenta estrutura bidimensional ou tridimensional e compreendendo tecido formado por MSCs diferenciadas e matriz óssea desmineralizada, em que a referida matriz óssea desmineralizada está dispersa dentro do tecido de MSCs diferenciadas e em que as ditas MSCs são células tronco derivadas de tecido adiposo.
2. Biomaterial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as MSCs utilizadas para produzir o tecido de MSCs diferenciadas são de origem humana ou animal.
3. Biomaterial de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que as MSCs são células-tronco derivadas de tecido adiposo, obtidas em passagem avançada.
4. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende osteócitos revestidos com uma camada mineral e um tecido interconectivo incluindo colágeno.
5. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende condrócitos e uma matriz extracelular incluindo colágeno e proteoglicanos.
6. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a matriz óssea desmineralizada está na forma de partículas tendo um diâmetro médio de 50 – 2500 μm .
7. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que é capaz de secretar fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).
8. Implante, caracterizado pelo fato de que compreende um biomaterial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 7.
9. Implante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos duas camadas de biomaterial como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
10. Método para produzir um biomaterial bidimensional ou tridimensional como definido em qualquer uma das reivindicações 1 - 7, caracterizado pelo fato de que compreende incubar MSCs em meio osteoblástico

e/ou condrogênico durante 15 a 25 dias e, em seguida, adicionar matriz óssea desmineralizada ao referido meio e manter a incubação por um período adicional de 15 a 30 dias.

5 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o meio osteoblástico é um meio padrão que é suplementado com soro humano, dexametasona, ascorbato de sódio, di-hidrofosfato de sódio, penicilina e estreptomicina.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o meio condrogênico é um meio padrão que é suplementado com soro humano, dexametasona, TGF-B3, L-prolina, ascorbato de sódio, di-hidrofosfato de sódio, piruvato de sódio, insulina-transferrina-selênio, penicilina e estreptomicina.

15 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que a matriz óssea desmineralizada é adicionada ao meio em uma quantidade de 5 a 10 mg/mL.

14. Biomaterial bidimensional ou tridimensional, caracterizado pelo fato de que é obtido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 10 – 13.

20 15. Dispositivo médico, caracterizado pelo fato de que compreende o biomaterial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 7 e 14.

16. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o biomaterial como definido em qualquer uma das reivindicações 1 – 7 e 14 e um meio adequado para fixação.

25 17. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 14, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um dispositivo médico para atenuar ou tratar defeito ósseo ou cartilaginoso.

30 18. Biomaterial de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 e 14, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um dispositivo médico para sustentar ou corrigir anormalidades congênitas ou adquiridas das articulações, ossos crânio-facial-maxilar, procedimentos ortodônticos, reposição óssea ou osteoarticular após cirurgia, trauma ou outras anormalidades

congênitas ou adquiridas ou para sustentar outros implantes musculoesqueléticos, especialmente implantes artificiais e sintéticos.