

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

Avaliação do potencial osteogênico de células estromais do foco de pseudoartrose

FREDERICO COUTINHO DE MOURA VALLIM

Rio de Janeiro

2016

Frederico Coutinho de Moura Vallim

Avaliação do potencial osteogênico de células estromais do foco de pseudoartrose

Dissertação apresentada ao do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em ciências.

Orientador (es): Prof. Dra. Danielle Cabral Bonfim

Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães

RIO DE JANEIRO

2016

AUTOR: FREDERICO COUTINHO DE MOURA VALLIM

Avaliação do potencial osteogênico de células estromais do foco de pseudoartrose

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Danielle Cabral Bonfim

Prof. Dr. João Antônio Matheus Guimarães

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marco Bernardo Cury Fernandes (INTO)

Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti (INTO)

Prof. Dr. William Dias Belangero (Unicamp)

Rio de Janeiro, Janeiro de 2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

V135a Vallim, Frederico Coutinho de Moura.

Avaliação do potencial osteogênico de células estromais do foco de pseudoartrose. / Frederico Coutinho de Moura Vallim. — 2016.
91f.

Orientadores: Danielle Cabral Bonfim e João Antônio Matheus Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.

1. Pseudoartrose. 2. Célula estromal. 3. Fratura. 4. Osteogênese. 5. Consolidação óssea. 6. Osteoprogenitores. 7. Ortopedia. I. Bonfim, Danielle Cabral; Guimarães, João Antônio Matheus, orient. II. Título.

NLM WE XXX

À Amanda, minha esposa, meu amor, e à nossa pequena Bela.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Janine e Ronaldo, que sempre incentivaram minha carreira e me deram educação e o melhor exemplo para formação do meu caráter,

Aos professores que passaram pela minha vida, por dispensarem tempo neste sacerdócio da formação intelectual e moral de indivíduos tão diversos,

Em especial ao meu grande professor e amigo Dr João Antônio Matheus Guimarães, que além de orientar essa fase acadêmica importante da minha carreira, sempre foi o exemplo de cirurgião que norteou minha caminhada,

À Dra Danielle Bonfim, que participou de forma primordial desta dissertação, sempre solícita, paciente, uma verdadeira orientadora e uma pesquisadora de altíssimo padrão. Com certeza, sem ela nada do que produzimos teria acontecido,

À Dra Maria Eugênia Leite Duarte e ao Dr José Inácio Salles, que sonharam e realizaram este projeto de mestrado no INTO,

A todo o grupo de pesquisadores do CTCEL do INTO, que ajudaram nos experimentos, nas formatações de texto, nas captações de amostras, e em todos os momentos em que o desespero batia à porta de um ortopedista novato na área de pesquisa celular,

Aos residentes do INTO que em algum momento participaram das cirurgias e ambulatorios, dando o primordial suporte para que todas as amostras fossem colhidas,

Aos cirurgiões do grupo do Trauma, enfermeiros, técnicos de enfermagem e radiologia, e todo o pessoal que participa do dia a dia do centro cirúrgico do INTO, permitindo que os pacientes sejam beneficiados com o tratamento cirúrgico tão esperado.

“Quanto mais aumenta o nosso conhecimento, mais fica
evidente a nossa ignorância.”

John F. Kennedy

RESUMO

VALLIM, Frederico CM. Avaliação do potencial osteogênico de células estromais isoladas do foco de pseudoartrose. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2016.

Dentre os tecidos do sistema musculoesquelético, o osso possui a maior capacidade regenerativa, promovendo a restauração total da forma e função originais. Contudo, falhas no processo de consolidação de fraturas eventualmente ocorrem, resultando na não união ou pseudoartrose. Diante do grande número crescente de pacientes que sofrem traumas de diversas origens, os índices de pseudoartrose e incapacidade física aumentaram proporcionalmente. Sua etiopatogenia ainda não é de todo compreendida. Diversos estudos demonstraram que os tecidos dos focos de pseudoartrose hipertrófica e atrófica contém uma população celular com fenótipo similar ao de células mesenquimais do estroma da medula óssea, gerando a hipótese de que estes tecidos sejam reservatórios de células mesenquimais originadas do hematoma fraturário agudo, que interromperam sua diferenciação durante o processo de consolidação. Resta a esclarecer, contudo, se esta interrupção estaria relacionada a: (i) um defeito intrínseco nos osteoprogenitores, que os impediria de responder aos estímulos de diferenciação; ou (ii) de disfunções na sinalização no microambiente, que levariam às células a entrarem em um estado quiescente, interrompendo o processo de formação óssea. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfofuncionais e a capacidade de diferenciação osteogênica de células isoladas do foco fraturário de pacientes com pseudoartrose atrófica e hipertrófica. Observou-se que estas células possuem perfil imunofenotípico característico de células osteoprogenitoras, hierarquicamente mais diferenciadas do que as células mesenquimais da medula óssea. *In vitro*, sua taxa de proliferação é mais lenta do que a das células mesenquimais da medula óssea, porém esta característica não está associada a uma maior propensão à entrada em estado de senescência. Quanto ao potencial de diferenciação, tanto as células estromais das pseudoartroses hipertróficas como atróficas foram capazes de se diferenciar para as vias adipogênica e osteogênica *in vitro*. A capacidade de formação óssea de células estromais da pseudoartrose atrófica também foi observada *in vivo*. Em conjunto, os resultados deste estudo mostraram células osteoprogenitoras com capacidade de formação de osso comparável a células osteoprogenitoras isoladas de sítios não patológicos, presentes nos focos de pseudoartrose.

Palavras-chave: Pseudoartrose atrófica, Pseudoartrose hipertrófica, Células estromais, Fraturas, Consolidação óssea.

ABSTRACT

VALLIM, Frederico CM. Osteogenic potential of nonunion tissue-derived stromal cells. Rio de Janeiro, 2016. Master Thesis. (Master's Degree in Musculoskeletal System Applied Sciences) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2016.

Among the tissues that compose the musculoskeletal system, bone has the major regenerative capacity, being able to restore full original form and function. However, fracture healing failures eventually occur, resulting in nonunion. Due to the increasing number of patients with fractures of different origins, nonunion and physical impairment have grown proportionally in urban trauma centers. Its pathogeny is still not fully understood. Several studies have shown that atrophic and hypertrophic nonunion foci tissues contain a stromal cell population with a phenotype similar to bone marrow mesenchymal stromal cells (BMSC). This raised the hypothesis that nonunion tissues are a reservoir of mesenchymal stromal cells originated from acute fracture hematoma, which interrupted their differentiation during the fracture healing process. However, it remains unclear whether the failures in consolidation are a consequence of either: (i) an intrinsic defect in osteoprogenitors, making them unable to respond to differentiation stimuli, or (ii) to dysfunctions in microenvironment signaling, which would stimulate a quiescent cell state and the interruption of the repair process. The present study aimed at evaluating the morphofunctional characteristics and the osteogenic potential of atrophic and hypertrophic nonunion tissue-derived stromal cells (NUSC). It was observed that NUSC have an immunophenotypic profile characteristic of more committed osteoprogenitors in comparison to BMSC. *In vitro*, it has lower proliferative rates than BMSC, which is not related to an increased tendency to enter a senescent state. In regard to differentiation potential, both atrophic and hypertrophic NUSC were able to differentiate along the adipogenic and osteogenic pathways *in vitro*. The bone-forming capacity of atrophic NUSC was also observed *in vivo*. Altogether, the results of this study show that the cells present in the nonunion tissue are osteoprogenitors, with bone-forming capacity comparable to osteoprogenitors derived from non-pathological environments.

Keywords: Atrophic nonunion, Hypertrophic nonunion, Stromal cells, Fractures, Bone healing

Sumário

1.	Introdução	18
	1.1 Consolidação óssea <i>versus</i> não união e pseudoartrose: definições.	18
	1.2 Tipos de consolidação e eventos biológicos envolvidos.....	22
	1.2.1 Consolidação primária.....	22
	1.2.2 Consolidação secundária.....	23
	1.3 Etiopatogenia da pseudoartrose.....	26
	1.3.1 Alterações genômicas.....	27
	1.3.2 Alterações na expressão gênica.....	29
	1.3.3 Aspecto vascular.....	30
	1.3.4 Aspectos celulares.....	31
	1.3.4.1 Células mesenquimais da medula óssea: conceitos do sistema <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>	32
	1.3.4.2 Potencial de diferenciação de células mesenquimais e pseudoartrose.....	35
2.	Objetivos	38
	2.1 Objetivo Geral.....	38
	2.2 Objetivos Específicos.....	38
3.	Material e Métodos	39
	3.1 Seleção de pacientes e coleta de amostras teciduais.....	39
	3.2 Diagnóstico de pseudartrose.....	39
	3.3 Coleta de amostras teciduais.....	40
	3.4 Aspectos éticos.....	41
	3.5 Isolamento de células mesenquimais do estroma da medula óssea (BMSC).....	42
	3.6 Ensaio de eficiência de formação de colônias – CFE.....	42
	3.7 Isolamento de células do foco de pseudoartrose (NUSC) e do tecido ósseo (HOB).....	43
	3.8 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	43
	3.9 Análise de duplicação populacional.....	43
	3.10 Análise de senescência.....	44
	3.11 Diferenciação osteogênica e adipogênica <i>in vitro</i>	45

3.12	Avaliação <i>in vivo</i> do potencial osteogênico das NUSC	46
3.13	Análise Estatística	47
4.	Resultados	48
4.1	Características dos doadores.....	48
4.2	Frequência e potencial clonogênico de progenitores mesenquimais na medula óssea.....	49
4.3	Caracterização morfológica e imunofenotípica das células do foco de pseudoartrose.....	53
4.4	Análise da atividade proliferativa e do grau de senescência <i>in vitro</i> de BMSC, HOB e NUSC	57
4.5	Avaliação do potencial de diferenciação <i>in vitro</i> de BMSC, HOB e NUSC.....	60
4.6	Avaliação do potencial osteogênico <i>in vivo</i> de NUSC atrófica.	62
5.	Discussão	64
6.	Conclusões	72
7.	Referências Bibliográficas	73
8.	Apêndices e/ou Anexos	81

Lista de Figuras

Figura 1. Radiografias representativas de pseudoatroses.....	20
Figura 2. Esquema ilustrativo de consolidação de fratura diafisária de osso longo.....	24
Figura 3. Coleta e aspecto macroscópico das amostras teciduais.....	41
Figura 4. Ensaio de Unidades formadoras de colônias fibroblastóides.....	51
Figura 5. Aspecto morfológico das células após expansão <i>in vitro</i>	53
Figura 6. Caracterização do perfil imunofenotípico das células isoladas de focos de pseudoartrose atrófica.....	55
Figura 7. Caracterização do perfil imunofenotípico das células isoladas de focos de pseudoartrose hipertrófica	56
Figura 8. Ensaio para avaliação do tempo de duplicação celular.....	57
Figura 9. Ensaio <i>in vitro</i> de senescência celular.....	59
Figura 10. Avaliação do potencial <i>in vitro</i> de diferenciação adipogênica das células isoladas do foco de pseudoartrose.....	60
Figura 11. Avaliação do potencial <i>in vitro</i> de diferenciação osteogênica das células isoladas do foco de pseudoartrose.....	61
Figura 12. Potencial de formação óssea <i>in vivo</i> das células isoladas do foco de pseudoartrose.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos doadores das amostras teciduais.....	49
Tabela 2a e 2b. Ensaio de eficiência de formação de colônias nos pacientes com pseudoartrose hipertrófica e atrófica.....	52
Tabela 3. Análise estatística de tempo e total de duplicações populacionais	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AO	<i>Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen</i> (Grupo de estudo de assuntos relacionados à osteossíntese de fraturas)
ANOVA	Análise de variância
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
bFGF	<i>Basic fibroblastic growth factor</i> (fator de crescimento básico de fibroblasto)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética do osso)
BMSC	<i>Bone marrow mesenchymal stromal cell</i> (Célula mesenquimal estromal da medula óssea)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais
CFE	Colony forming efficiency
CFU-F	Colony forming unit – Fibroblast
Cm ²	centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbon
cPD	número total de duplicações populacionais
CTC	Centro de Tecnologia Celular
DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's modified essential medium</i> (Meio essencial modificado por Dulbecco)
DP	Desvi padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etileno-diamino-tetracético)

EP	Erro padrão
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i> (Célula progenitora endotelial)
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor</i> receptor 1 (receptor tipo 1 de Fator de crescimento de fibroblasto)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
g	gravidade
GDF	<i>Growth differentiation factor</i> (Fator de diferenciação do crescimento)
h	hora
HA/TCP	Hidroxiapatita / tricálcio fosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H&E	Hematoxilina e Eosina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HOB	<i>Human osteoblasts</i> (Osteoblastos humanos)
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i> (3-Isobutil-1-metilxantina)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina)
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleucina
IL-1RI	<i>Interleukin-1 receptor I</i> (Receptor tipo I de Interleucina-1)
IL-1RII	<i>Interleukin-1 receptor II</i> (Receptor tipo II de Interleucina-1)
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i> (substrato de receptor de insulina)
ISCT	International society for cellular therapy (sociedade internacional para terapia celular)

LRP	<i>Low density lipoprotein receptor related protein</i> (proteína de receptor relacionado a lipoproteína de baixa densidade)
M	molaridade
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de macrófagos)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> (Proteína quimiotóxica de monócitos)
MIP- α	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (Proteína inflamatória de macrófagos)
mM	milimol
MMP	Metaloproteinase
MS	Ministério da Saúde
MSC	<i>Mesenchymal stromal cell</i> (Célula mesenquimal estromal)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (sintetase de óxido nítrico)
NUSC	<i>Non-union stromal cell</i> (Célula estromal derivada da pseudoartrose)
OPG	<i>Osteoprotegerin</i> (Osteoprotegerina)
P.A.	Pró análise
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (solução salina tamponada)
PD	<i>Population doublings</i> (Duplicações populacionais)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PIGF	<i>Placental growth factor</i> (Fator de crescimento placentário)
PTHrP	<i>Parathyroid hormone related protein</i> (proteína relacionada a paratormônio)

RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B)
RUST	Radiographic union scale for tibial fractures (Escala de união radiográfica de fraturas tibiais)
SDF	<i>Stromal-derived factor</i> (Fator derivado de estroma)
SFB	Soro fetal bovino
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
SSC	<i>Skeletal stem cell</i> (célula tronco esquelética)
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i> (Fator de crescimento transformador- β)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> (Fator de necrose tumoral – α)
TNF- β	<i>Tumor necrosis factor-β</i> (Fator de necrose tumoral – β)
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i> (Receptor tipo 1 do fator de necrose tumoral)
TNFR2	<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i> (Receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral)
T _{PD}	tempo de duplicação populacional
U/mL	Unidade/mililitro
VEGF	<i>Vascular-endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento vascular endotelial)
VEGFR2	<i>Vascular-endothelial growth factor receptor-2</i> (Receptor tipo 2 do fator de crescimento vascular endotelial)
w/v	<i>weight/volume</i> (peso/volume)

X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i> (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranosídeo)
Δt	intervalo de tempo
μg/mL	micrograma/mililitro
μL	microlitro
μm	micrômetro
°C	grau Celsius
%	percentual

1. INTRODUÇÃO

Dentre os componentes do sistema musculoesquelético, o osso é o único órgão com verdadeira capacidade regenerativa, restaurando totalmente sua forma e função após a ocorrência de uma fratura (ORYAN *et al.*, 2015). No entanto, o sucesso da regeneração óssea após uma fratura depende de uma multiplicidade de fatores, tais como a extensão da lesão dos tecidos adjacentes, a presença de infecção, a extensão da perda óssea, a distância entre os fragmentos ósseos no foco de fratura, além de estabilização mecânica adequada. Dessa forma, dependendo da gravidade da fratura, a capacidade regenerativa do osso pode ser significativamente comprometida (BORRELLI *et al.*, 2012; BETTS e MULLER, 2014; METSEMAKERS *et al.*, 2015; ORYAN *et al.*, 2015).

1.1 Consolidação óssea versus não união e pseudoartrose: definições

Apesar de haver variação no tempo de consolidação de fraturas em diferentes ossos, em geral uma fratura diafisária de ossos longos consolida após 3-4 meses (FROLKE e PATKA, 2007). A consolidação óssea é definida tanto a partir de critérios clínicos como radiológicos (EBRAHEIM *et al.*, 1991; MEGAS, 2005; CALORI *et al.*, 2007; FROLKE e PATKA, 2007; BROWNER *et al.*, 2008; CALORI *et al.*, 2008; DIMITRIOU *et al.*, 2013b). Clinicamente, uma fratura é considerada consolidada quando há ausência de dor e mobilidade em resposta ao estresse normal sobre o membro e o mesmo apresenta habilidade plena de sustentação de carga, sem suporte externo (FROLKE e PATKA, 2007, BROWNER *et al.*, 2008). Radiograficamente o critério de consolidação é a presença de ponte óssea (continuidade entre os fragmentos) em três das quatro corticais (anterior, posterior, medial e lateral) em radiografias ortogonais (FROLKE e PATKA, 2007).

A não união é definida como ausência de progressão do calo ósseo no período de 6-9 meses após a ocorrência da fratura. Após nove meses de não união, sem sinal de progressão do calo por três meses consecutivos, caracteriza-se a pseudoartrose. O aspecto anatomopatológico clássico é a formação de uma falsa articulação sinovial, formada por tecido fibrocartilaginoso. Alguns autores definem a pseudoartrose como sendo o estágio final do processo de não união, quando seu quadro algico é substituído pela ausência de dor no foco fraturário (FROLKE e PATKA, 2007).

Classicamente a pseudoartrose é classificada em atrófica ou hipertrófica. Este sistema de classificação foi descrito em 1976 por Weber e Cech e define os tipos de pseudoartrose baseados na sua vitalidade (ou viabilidade) e potencial de consolidação. Segundo os autores, as pseudoartroses hipertróficas são caracterizadas pela existência de calo ósseo exuberante, que não evolui a ponto de formar as pontes ósseas que definem a consolidação, por causa de falhas na estabilização mecânica (WEBER e CECH, 1976) (Fig.1A). Assim, uma vez corrigida a micromovimentação excessiva, ocorre a consolidação (PERREN, 2002). Por outro lado, as pseudoartroses atróficas não apresentam formação de calo, ou este é incipiente, e seriam decorrentes de falhas biológicas (Fig.1B). Seu tratamento, portanto, necessita de aporte biológico ao foco de fratura, através de enxertia autóloga (FROLKE e PATKA, 2007).

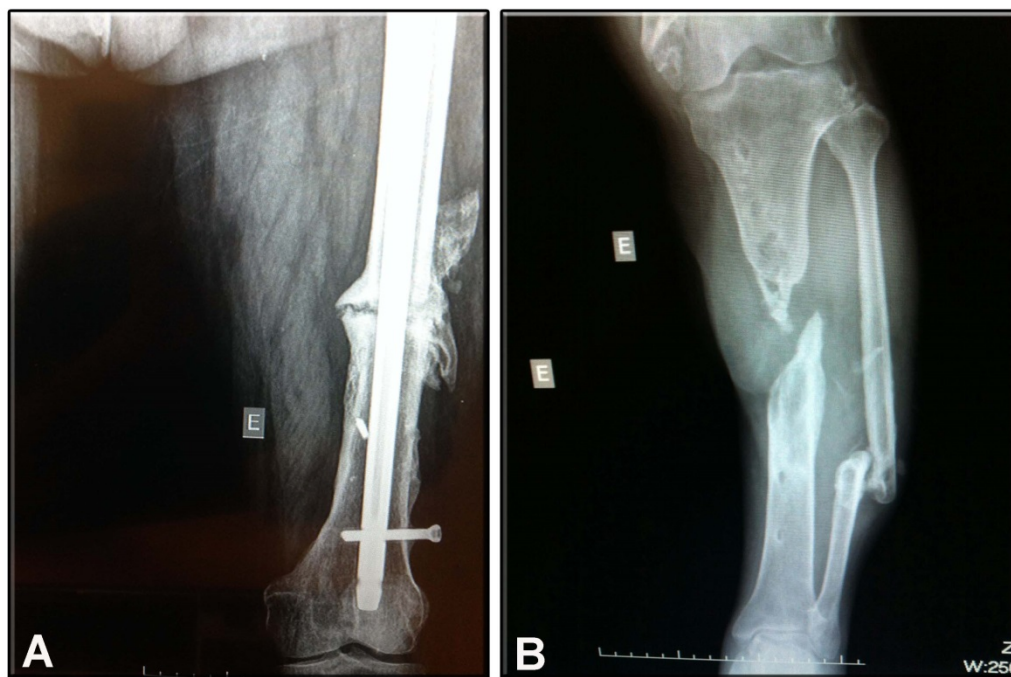


Figura 1. Radiografias representativas de pseudoatroses. (A) Radiografia em antero posterior do fêmur evidenciando extensa osteoformação e permanência da linha de fratura (B) Radiografia em anteroposterior da tíbia com extensa perda óssea e ausência de osteoformação regenerativa. Fonte: Arquivo INTO.

A primeira descrição macroscópica dos tecidos encontrados no foco fraturário de pacientes com pseudoartrose foi realizada em 1954 por Urist e colaboradores. Nesta ocasião os autores consideraram que o mecanismo responsável pela não união era o processo de “degeneração fibrinóide no interior do calo” que interferiria com a migração de células osteogênicas do endóstio/perióstio através do foc de fratura (URIST *et al.*, 1954).

A descrição microscópica de pseudoartrose foi realizada com maiores detalhes em estudos mais recentes (BROWNLOW *et al.*, 2002; BAJADA *et al.*, 2009; IWAKURA *et al.*, 2009; KWONG *et al.*, 2009; SCHWABE *et al.*, 2014). Na maior parte dos casos, o tecido é formado principalmente por pequenas áreas cartilaginosas, associadas à formação de pequena quantidade de osso imaturo e extensa formação de tecido fibroso. Não há diferenças significativas entre as células

do tecido cartilaginoso ou ósseo imaturo em relação aos mesmos tecidos encontrados em fraturas em consolidação (KWONG *et al.*, 2009). Nas pseudoartroses atróficas, a população celular predominante consiste em algumas células fibroblásticas, em meio a matriz extracelular colageinizada. Alguns osteoclastos também podem estar presentes no interior de lacunas, caracterizando seu estado de atividade (BAJADA *et al.*, 2009). Ainda em relação à pseudoartrose atrófica, as áreas de ossificação são em número reduzido, com predomínio da via endocondral de formação óssea. Já na hipertrófica tanto a via via endocondral quanto a intramembranosa são utilizadas (REED *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas, o aumento do número de fraturas decorrentes de trauma de alta energia como acidentes de trânsito, lesões por arma de fogo e quedas de alturas elevou o número de casos de pseudoartrose. Em fraturas fechadas, ocasionadas por trauma de baixo impacto, sua incidência é de aproximadamente 2,5%. Já nas fraturas abertas, contaminadas e com perda de partes moles, esse índice chega até 41%. Tais complicações geram alto custo social, além de limitações na capacidade física de uma população jovem e economicamente ativa (BROWNER *et al.*, 2008).

Dessa forma, há uma alta demanda por tratamentos alternativos para estimular ou restaurar a regeneração óssea em pacientes com pseudoartrose. Embora inúmeras estratégias tenham sido exploradas com o intuito de desenvolver novos protocolos clínicos, principalmente no âmbito da bioengenharia tecidual e terapia celular (LONGO *et al.*, 2012; GIANNOTTI *et al.*, 2013; LIEBERGALL *et al.*, 2013; GOMEZ-BARRENA *et al.*, 2015), a translação dos estudos experimentais para a prática clínica permanece abaixo das expectativas. Uma das razões para esse atraso é o conhecimento incompleto dos mecanismos biológicos envolvidos no

processo de consolidação óssea e como estes fatores estão envolvidos na etiopatogenia da pseudoartrose (GOMEZ-BARRENA *et al.*, 2015).

1.2 Tipos de consolidação e eventos biológicos envolvidos

Dependendo do espaço entre os fragmentos ósseos e a forma de fixação mecânica da fratura, podem ocorrer dois tipos de consolidação: primária (direta) ou secundária (indireta) (ORYAN *et al.*, 2015).

1.2.1 Consolidação primária

Este tipo de consolidação ocorre somente quando há redução anatômica, isto é, aposição perfeita dos bordos da fratura, restaurando o contato entre os fragmentos, e a fixação é feita de forma estável e rígida. Assim, a formação óssea ocorre por via intramembranosa, diretamente a partir da agregação e diferenciação de osteoprogenitores (PERREN, 1999; ORYAN *et al.*, 2015).

Quando o intervalo entre os fragmentos é menor que 0,01mm e o movimento interfragmentar é menor do que 2%, isto é, o aumento do espaço entre dois fragmentos ósseos não supera 2% do seu comprimento inicial, ocorre a consolidação direta por contato (SHAPIRO, 1988). Estruturas denominadas “cones cortantes” formam-se nas extremidades dos ósteons, a partir dos quais os osteoclastos geram cavidades longitudinais que são posteriormente preenchidas por matriz óssea sintetizada por osteoblastos (EINHORN e GERSTENFELD, 2015). Dessa forma, a continuidade entre os fragmentos é refeita, assim como novos canais Haversianos, que posteriormente serão atravessados por vasos sanguíneos neoformados (BUCKWALTER *et al.*, 1996; ORYAN *et al.*, 2015). Portanto, este tipo de consolidação se dá sem a formação de um calo ósseo periosteal. O osso lamelar

recém depositado é alinhado paralelamente ao eixo longitudinal do osso maduro e é inicialmente menos denso (BUCKWALTER e COOPER, 1987; ORYAN *et al.*, 2015).

Quando a distância entre as extremidades ósseas é de 800µm a 1 mm, ao contrário da consolidação direta por contato, a união óssea e a remodelação dos canais de Harvers não ocorrem simultaneamente (EINHORN e GERSTENFELD, 2015). Neste caso, a deposição de matriz óssea ocorre perpendicularmente ao eixo do osso, exigindo posteriormente a reconstrução do ósteon (MCKIBBIN, 1978). O osso imaturo é gradualmente substituído por osso lamelar depositado ao longo do maior eixo do osso, reestabelecendo a estrutura dos ósteons, dos canais de Harvers e a revascularização (SHAPIRO, 1988). Todo este processo ocorre entre três e oito semanas após a fratura. Em seguida se inicia uma remodelação secundária, similar a que ocorre com o processo de consolidação por contato, através da remodelação pelos osteoclastos (EINHORN e GERSTENFELD, 2015).

Como a consolidação primária exige fixação rígida, este processo não ocorre com frequência no tratamento de fraturas diafisárias de ossos longos, cujo padrão atual baseia-se em métodos de estabilidade relativa, que visam permitir micromovimento entre os fragmentos ósseos do foco fraturário. Entre os métodos utilizados com este intuito existem a fixação intramedular, a fixação externa e a fixação interna em ponte, principalmente no caso de fraturas multifragmentares (BROWNER *et al.*, 2008).

1.2.2 Consolidação secundária

A consolidação secundária, ou indireta, ocorre quando não há redução anatômica e estabilização absoluta da fratura. Por isso, é a forma de consolidação mais comum na prática clínica (MCKIBBIN, 1978) e consiste na combinação dos dois processos de ossificação: endocondral e intramembranosa (GERSTENFELD *et*

al., 2003). Trata-se de uma série de eventos altamente organizada, dividida em três etapas principais e consecutivas: a resposta inflamatória, seguida pela neoformação tecidual e o remodelamento (GERSTENFELD *et al.*, 2003; EINHORN, 2005; MARSELL e EINHORN, 2011; PERREN, 2015) (Fig.2).

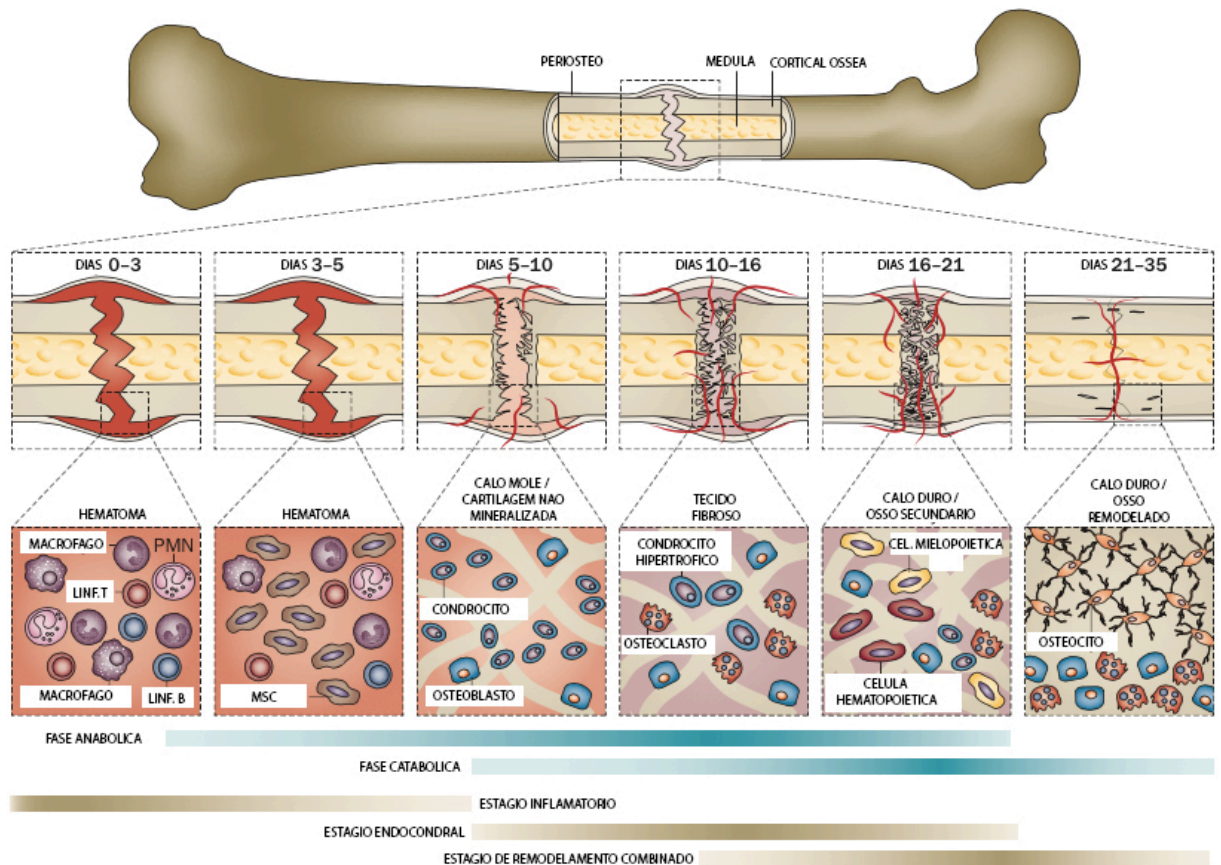


Figura 2. Esquema ilustrativo de consolidação de fratura diafisária de osso longo. Etapas do processo de consolidação secundária ilustrando os eventos celulares que caracterizam as fases anabólica e catabólica, o estágio inflamatório, o estágio endocondral e o remodelamento combinado. A escala temporal equivale à de uma fratura fechada de fêmur de rato fixada com haste intramedular (Modificado de Einhorn e Gerstenfeld, 2015). PMN= leucócito polimorfonuclear; Linf T = linfócito T; Linf B= linfócito B; MSC= célula tronco mesenquimal.

Seguindo-se o trauma, o rompimento de vasos sanguíneos e o extravasamento do conteúdo medular liberam mediadores pró-inflamatórios que ativam a cascata de coagulação, ocasionando a formação de um hematoma, que preenche todo o espaço entre os fragmentos ósseos, conectando a medula óssea, o periósteo, o

endósteo e o tecido muscular adjacente. A formação do hematoma cria um microambiente único no local da fratura, que é fundamental para as etapas subsequentes do processo de regeneração (SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2015). As células do sistema imunológico inato, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, presentes no hematoma, iniciam a secreção de citocinas e quimiocinas, que amplificam a resposta pró-inflamatória local, promovendo sua invasão por células provenientes da circulação periférica (EINHORN e GERSTENFELD, 2015). Como primeiras células da linha de defesa, os neutrófilos iniciam uma resposta de defesa contra os agentes patógenos através de fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio como superóxido e peróxido de hidrogênio, que atuam nas reações de estresse oxidativo, destruindo os agentes patógenos. Além disso, os neutrófilos induzem a secreção de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (GLASS *et al.*, 2011; CHAN *et al.*, 2015), que por sua vez resulta na liberação de sinais inflamatórios secundários, como MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*) e MIP- α (*Macrophage Inflammatory Protein*), que estimulam o recrutamento de monócitos e macrófagos (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010). Simultaneamente, TNF- α atua como um agente quimiotático de células necessárias ao processo de neoformação tecidual, como as células mesenquimais (KON *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2002).

Uma vez ativados, os macrófagos atuam na remoção fagocítica de restos necróticos e secretam fatores necessários para o recrutamento, migração e proliferação de células mesenquimais, progenitores endoteliais e osteoblastos, tais como IL-1 (*Interleukin*), BMP (*bone morphogenetic proteins*) -2, -5 e -7, bFGF (*basic fibroblastic growth factor*), TGF- β (*transforming growth factor- β*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) e IGF (*insulin-like growth factor*) (ORYAN *et al.*, 2015). A secreção de IL-1 induz a produção de IL-6 pelos osteoblastos periosteais, que por sua vez estimula a diferenciação das células mesenquimais recrutadas e a

angiogênese local através da secreção de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (KON *et al.*, 2001; WALSH *et al.*, 2006).

Em resposta aos fatores de crescimento secretados, as células mesenquimais presentes nas áreas mais centrais e hipóxicas do foco fraturário diferenciam-se em condroblastos, dando origem ao calo mole cartilaginoso. Nas porções distais da fratura os osteoblastos periosteais iniciam o processo de ossificação intramembranosa, sintetizando osso imaturo. Com o avanço da formação de cartilagem nas regiões mais centrais, TGF- β (*transforming growth factor*- β) -2 e -3 e TNF- α induzem a hipertrofia e apoptose dos condrócitos, a produção de VEGF e o início da mineralização da matriz. Enquanto a cartilagem é calcificada, vasos sanguíneos invadem a região, trazendo um aporte de condroclastos e novas células mesenquimais. Os condroclastos removem a matriz cartilaginosa calcificada e as células mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos, que iniciam a deposição de osso imaturo. Dessa forma, o calo mole é substituído pelo calo duro (EINHORN e GERSTENFELD, 2015).

Na fase de remodelamento, os osteoclastos reabsorvem o osso imaturo enquanto os osteoblastos resintetizam a matriz na forma de osso lamelar. Assim, o calo duro é modelado, restaurando a sua forma e tamanho e as propriedades biomecânicas originais do segmento ósseo (ORYAN *et al.*, 2015).

1.3 Etiopatogenia da pseudoartrose

Considerando-se a teoria de Weber e Cech, de 1976, que é a mais amplamente aceita, tem-se uma relação direta de causa e efeito entre falha mecânica e pseudoartrose hipertrófica e falha biológica e pseudoartrose atrófica (WEBER e CECH, 1976). No entanto, está cada vez evidente que a pseudoartrose é uma

condição multifatorial (MEGAS, 2005; HOBBY e LEE, 2013; HADJIARGYROU e O'KEEFE, 2014; EINHORN e GERSTENFELD, 2015; METSEMAKERS *et al.*, 2015). Diversos aspectos relacionados à fratura, como o tipo e a intensidade de energia do trauma, a distância entre os fragmentos fraturários, o tamanho, alinhamento e estabilidade desses fragmentos e a presença de infecção podem influenciar negativamente o processo de regeneração óssea (CALORI *et al.*, 2008; BORRELLI *et al.*, 2012; HOBBY e LEE, 2013; BETTS e MULLER, 2014; METSEMAKERS *et al.*, 2015). Do mesmo modo, características do indivíduo, como idade, sexo, quadro geral de saúde e o histórico de cirurgias pregressas também podem contribuir de forma significativa no processo de consolidação óssea (MEGAS, 2005; BORRELLI *et al.*, 2012; DRISSI *et al.*, 2014). Se estas condições forem controladas, resta a complexidade biológica inerente da regeneração óssea como causa a ser explorada. Uma vez que a consolidação óssea envolve diversas interações celulares, que dependem da sinalização mediada por inúmeras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, qualquer alteração nesses eventos pode resultar na interrupção da formação óssea e desenvolvimento de pseudoartrose (MARSELL e EINHORN, 2011).

1.3.1 Alterações genômicas

A observação clínica de grupos de pacientes com padrões de fratura e fatores de risco semelhantes resultando em desfechos distintos de consolidação, levantou a hipótese de predisposição/susceptibilidade genética de certos indivíduos ao desenvolvimento de pseudoartrose (DIMITRIOU *et al.*, 2011; DIMITRIOU e GIANNOUDIS, 2013a). Neste contexto, estudos envolvendo a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) foram realizados para avaliar alterações em genes envolvidos no processo de

consolidação (DIMITRIOU *et al.*, 2011; ZECKEY *et al.*, 2011; DIMITRIOU e GIANNOUDIS, 2013a; GUIMARÃES *et al.*, 2013; SATHYENDRA *et al.*, 2014).

Os SNPs representam uma nova geração de marcadores genéticos que caracterizam a alteração, deleção ou inserção de um único nucleotídeo em uma sequência gênica (NAKAMURA, 2009). Eles são utilizados como forma de relacionar variabilidade genética à diversidade fenotípica e propensão a doenças (MCCARTHY *et al.*, 2008).

Em 2013, Dimitriou e colaboradores demonstraram uma relação positiva entre pseudoartrose atrófica e a existência de polimorfismos nos genes de Noggin e Smad-6, que atuam na cascata de sinalização de BMPs, cujo papel é fundamental na indução da formação óssea (DIMITRIOU *et al.*, 2013b). De forma similar, foi observada uma associação significativa entre haplótipos dos genes de PDGF (ZECKEY *et al.*, 2011), BMP-4, FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor*) (GUIMARÃES *et al.*, 2013), IL-1 β , NOS2 (*Nitric oxide synthase*) (SATHYENDRA *et al.*, 2014) e pseudoartrose, indicando que polimorfismos nesses genes podem representar um fator de risco para o seu desenvolvimento.

Contudo, é importante salientar que embora as variações genéticas possam conferir susceptibilidade ou resistência a determinada doença, a maioria das doenças genéticas não são causadas exclusivamente por uma única alteração gênica (MCCARTHY *et al.*, 2008). Ao contrário, são determinadas por interações complexas entre múltiplos genes e fatores ambientais, que podem resultar ou não em perda de função (NAKAMURA, 2009). Por isso, ainda não existem provas definitivas de que uma predisposição genética seja determinante para a consolidação óssea deficiente (DIMITRIOU *et al.*, 2013b).

1.3.2 Alterações na expressão gênica

Um número crescente de estudos em modelos animais demonstra que alterações na expressão gênica, e consequentemente, no nível de expressão de proteínas envolvidas nas diferentes etapas do processo de regeneração óssea podem contribuir ou resultar diretamente na inibição da consolidação (MARSELL e EINHORN, 2011).

Quanto à influência de citocinas, fatores de crescimento e hormônios, Gerstenfeld e colaboradores (2001) demonstraram que camundongos com deleção dos genes de p55 e p75, dois receptores de TNF- α , apresentaram inibição da formação óssea intramembranosa na região periosteal em fraturas diafisárias de tibia. Conforme o processo de consolidação avançou, verificou-se um atraso na hipertrofia dos condrócitos e na reabsorção da cartilagem. De forma semelhante, a deleção de Irs-1 (*Insulin receptor substrate*), necessário para a sinalização mediada por IGF-1 e insulina, resultou em falha de consolidação e acúmulo de tecido conjuntivo no local da fratura. Esta inibição resultou da formação do calo ósseo, e diminuição da proliferação de condrócitos (SHIMOAKA *et al.*, 2004). Já Wang e colaboradores (2013) demonstraram a importância do peptídeo relacionado ao hormônio paratiroideano (PTHrP, *parathyroid hormone-related peptide*), cujo papel é essencial na regulação fisiológica da formação e manutenção da massa óssea (KABACK *et al.*, 2008; ASPENBERG, 2013). Os pesquisadores observaram que a haploinsuficiência (deleção de um dos alelos) de PTHrP resultou na redução do tamanho do calo e na formação de cartilagem, diminuição na expressão de proteínas envolvidas na indução de diferenciação osteoblástica e na reabsorção óssea (WANG *et al.*, 2013).

No contexto da via de BMPs, observou-se que camundongos com deleção de BMP-2 não são capazes de formar calo ósseo em fraturas diafisárias de fêmur, indicando que a expressão desta proteína é fundamental para o início do processo

de consolidação (TSUJI *et al.*, 2006). Dos membros da via de Wnt, cuja ativação é necessária para a diferenciação de osteoprogenitores (PETERS *et al.*, 2008; KOMATSU *et al.*, 2010), verificou-se que a inativação do co-receptor LRP-5 (*Low density lipoprotein receptor related protein*) resultou na redução da área do calo, assim como seu conteúdo e densidade minerais (KOMATSU *et al.*, 2010). Também foi observado que a deleção de um dos alelos do gene de Wnt5a inibiu a formação do calo cartilaginoso (calo mole) e retardou a remoção da cartilagem e o remodelamento ósseo em fraturas fechadas de fêmur (CLIFTON *et al.*, 2014).

Sobre a regulação da via de sinalização de FGF, Su e colaboradores (2008) demonstraram que mutações com ganho de função do receptor FGFR3, conhecido por modular negativamente o processo de ossificação endocondral (COLVIN *et al.*, 1996; DENG *et al.*, 1996), resultou em retardo de consolidação, por inibição da diferenciação de células mesenquimais em condrócitos (SU *et al.*, 2008). Por fim, no contexto das MMPs (metaloproteinases), verificou-se que a deleção de MMP-13 inibiu significativamente a reabsorção de cartilagem no foco fraturário, como consequência da inibição da penetração de vasos sanguíneos e recrutamento de condrocitos (KOSAKI *et al.*, 2007).

1.3.3 Aspecto vascular

Embora a ocorrência de pseudoartrose atrófica tenha sido inicialmente atribuída à vascularização ineficiente na região da fratura, as evidências indicam que o aporte vascular nessa circunstância é normal e semelhante ao de pseudoartrose hipertrófica (QUACCI *et al.*, 1991; SANTAVIRTA *et al.*, 1992; REED *et al.*, 2002; BAJADA *et al.*, 2009). Através de análises por imunohistoquímica, outro estudo demonstrou não haver diferença significativa entre o número de vasos sanguíneos no tecido do foco fraturário obtido de pacientes com pseudoartrose atrófica, hipertrófica e

consolidações normais (REED *et al.*, 2002). Em estudo similar realizado recentemente, Schwabe e colaboradores (2014) também reportaram não haver diferença entre o grau de vascularização de tecidos obtidos de pacientes com pseudoartrose atrófica e com consolidação normal. Dessa forma, atualmente acredita-se que uma má vascularização não seja a principal causa de desenvolvimento de pseudoartrose (SCHWABE *et al.*, 2014).

1.3.4 Aspectos celulares

A observação de que o tecido de pseudoartrose não é avascular (REED *et al.*, 2002) reforçou a hipótese de Hernigou e Beaujean (1997) de que a pseudoartrose poderia estar associada à redução na frequência de osteoprogenitores na medula óssea, e consequentemente, no foco fraturário. De fato, posteriormente foram apresentadas evidências de que a frequência de células mesenquimais do estroma da medula (BMSC, *Bone Marrow Stromal Cells*) estaria reduzida em pacientes com pseudoartrose atrófica (SEEBACH *et al.*, 2007).

Corroborando estes achados, Mathieu e colaboradores (2013) observaram menor frequência de células mesenquimais em suspensões de aspirado de medula óssea da crista ilíaca de pacientes com pseudoartrose atrófica, em comparação com doadores normais. Entretanto, as células dos pacientes com pseudoartrose tinham potencial de diferenciação *in vitro* semelhante às derivadas dos doadores normais. Dessa forma, concluíram que apesar desses pacientes terem menos osteoprogenitores na medula óssea, a capacidade de diferenciação osteogênica dessas células estava preservada. No entanto, não foi descartada a possibilidade do recrutamento e migração das células mesenquimais não ocorrer de forma eficiente em pacientes com pseudoartrose, assim como do microambiente fraturário não

promover a sinalização adequada para induzir a formação óssea (MATHIEU *et al.*, 2013).

1.3.4.1 Células mesenquimais da medula óssea: conceitos do sistema *in vitro* versus *in vivo*

O termo “célula mesenquimal do estroma da medula óssea” refere-se a uma população celular altamente heterogênea, isolada através de sua capacidade de adesão aos frascos de cultivo, a partir de suspensões celulares totais da medula óssea (BIANCO *et al.*, 2013).

Na tentativa de entender a especificidade da relação entre osso e hematopoese, pesquisadores transplantaram fragmentos de medula óssea, sem osso, em sítios heterotópicos e inesperadamente observaram a formação de um ossículo, com histologia e arquitetura próprias do tecido ósseo. Dessa forma, concluíram que a medula óssea continha uma “entidade” com capacidade (potencial) para gerar osso (BIANCO *et al.*, 2013).

No entanto, as primeiras culturas *in vitro* de BMSC somente foram estabelecidas em uma série de experimentos realizados na década de 1970 por Alexander Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976; BIANCO, 2011; BIANCO *et al.*, 2013). Primeiramente, Friedenstein demonstrou que o potencial osteogênico da medula óssea estava contido numa fração de células do estroma que formava colônias quando cultivada em baixa densidade. Por isso, denominou-as “Unidade Formadora de Colônias Fibroblastóides” (CFU-F, *Fibroblast Colony Forming Unit*). Por fim, baseado na observação de que o transplante *in vivo* de células originadas a partir de uma única colônia no subcutâneo de camundongos gerava ossículos heterotópicos contendo todos os tipos celulares e tecidos encontrados em um segmento ósseo, isto é, osso, cartilagem, adipócitos e estroma

mielossuportivo, formulou a teoria de que a medula óssea continha uma segunda classe de células-tronco, que foi denominada “célula-tronco estromal” (BIANCO *et al.*, 2010; BIANCO *et al.*, 2013).

Na década de 90, considerando que os tecidos que compõem a medula óssea seriam derivados do mesênquima embrionário, Arnold Caplan sugeriu que a célula-tronco estromal seria um remanescente de uma célula-tronco mesenquimal embrionária (CAPLAN, 1991). A partir de então, cunhou-se o termo “célula-tronco mesenquimal”, que perdura nos dias atuais, embora sua validade conceitual seja criticada por estudiosos da área (HORWITZ *et al.*, 2005; BIANCO *et al.*, 2010; BIANCO *et al.*, 2013). Isto porque o termo “mesenquimal” também se refere a derivados mesodermais não esqueléticos, como coração, células endoteliais e músculo. Assim, todos esses tecidos seriam derivados de um ancestral comum. No entanto, além de não existirem evidências concretas da existência deste ancestral comum, esta teoria vem de encontro a conceitos do desenvolvimento embrionário, como a segregação do potencial osteogênico e miogênico dos somitos e a ausência de potencial miogênico no mesoderma lateral (BIANCO *et al.*, 2013). Além disso, argumenta-se que o próprio osso não possui um ancestral comum na fase embrionária. Componentes do esqueleto axial e apendicular são derivados de diferentes especificações do mesoderma e muitos ossos craniofaciais derivam do neuroectoderma (BIANCO *et al.*, 2010).

O termo “célula-tronco” também é questionável, uma vez que uma das principais propriedades de células-tronco, o potencial de autorrenovação, não é observado em todas as células de uma cultura de BMSC. Apenas uma fração específica das BMSC, que expressa o antígeno de superfície CD146, contém células capazes de gerar um ossículo contendo áreas de hematopoiese quando transplantadas *in vivo* e ainda restaurar o conjunto de células CD146⁺ (SACCHETTI

et al., 2007). De fato, Pittenger e colaboradores (1999) já haviam demonstrado anteriormente que somente um terço das colônias são multipotentes e capazes de diferenciação para as linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Enquanto células derivadas de algumas colônias podem formar osso, gordura e sustentar a hematopoese, outras somente formam osso ou tecido conjuntivo (MANKANI *et al.*, 2007; BIANCO *et al.*, 2008; SWORDER *et al.*, 2015).

Portanto, a fração de células isolada por adesão ao plástico é, na verdade, composta por populações celulares distintas, em diferentes estágios de diferenciação. Por isso, a adoção da nomenclatura “células mesenquimais do estroma” para estas culturas foi proposta pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy*) (HORWITZ *et al.*, 2005). Além disso, para serem consideradas BMSC, as células devem ter expressão comprovada de CD105 (glicoproteína de membrana denominada endoglina), CD73 (enzima denominada ecto-5'-nucleotidase) e CD90 (ou Thy-1, proteína de membrana originalmente expressa em timócitos) e capacidade de diferenciação *in vitro* para as linhagens osteoblástica, condrogênica e adipogênica (DOMINICI *et al.*, 2006).

In vivo existe ainda uma controvérsia significativa em relação à origem e identidade do que, *in vitro*, denomina-se conjuntamente de BMSC (BIANCO e COSSU, 1999; BIANCO *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008; BIANCO *et al.*, 2013; MORRISON e SCADDEN, 2014). Diante dos achados de Sacchetti e colaboradores (2007), nos quais verificou-se que as células com potencial de formar osso, gordura, cartilagem e recriar o microambiente hematopoético *in vivo* estavam contidas na subpopulação CD146⁺, formulou-se a teoria de que a “verdadeira” célula-tronco do estroma da medula, então denominada SSC (*Skeletal Stem Cell*) estaria contida nessa fração apenas (SACCHETTI *et al.*, 2007; BIANCO *et al.*,

2008). Em análises *in vivo*, células expressando CD146 foram observadas revestindo externamente a parede de sinusóides (SACCHETTI *et al.*, 2007), o que deu origem à teoria de que as SSC residam em um nicho perivascular (BIANCO *et al.*, 2008). No entanto, estudos demonstram que o nicho perivascular também é heterogêneo e composto por diversas populações celulares, envolvidas no controle da atividade de células-tronco hematopoiéticas (MENDEZ-FERRER *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2012; MORRISON e SCADDEN, 2014; ZHOU *et al.*, 2014). Dessa forma, a real identidade da SSC na medula óssea, assim como a hierarquia do seu processo de diferenciação até osteoblastos, condrócitos, adipócitos e estroma de sustentação da hematopoese, gerando diferentes níveis de progenitores, ainda são desconhecidos e objeto de ampla investigação (BIANCO *et al.*, 2013; CHAN *et al.*, 2013; SWORDER *et al.*, 2015; WORTHLEY *et al.*, 2015).

1.3.4.2 Potencial de diferenciação de células mesenquimais e pseudoartrose

As células-tronco e progenitores, além de manterem a homeostasia tecidual, também atuam na resposta a lesões, migrando para estes locais e iniciando a geração de células diferenciadas, que irão repor o tecido lesionado, seja através de regeneração do tecido original ou por geração de tecido cicatricial (HADJIARGYROU e O'KEEFE, 2014).

A possibilidade da frequência de células mesenquimais na medula de pacientes com pseudoartrose atrófica ser reduzida gerou a hipótese de que falhas na consolidação poderiam estar relacionadas à falta ou número insuficiente de células no foco fraturário (SEEBACH *et al.*, 2007). No entanto, estudos posteriores demonstraram que o tecido do foco de pseudoartrose contém células com

características semelhantes às BMSC, quando cultivadas *in vitro* (BAJADA *et al.*, 2009; IWAKURA *et al.*, 2009).

Estudando a composição do tecido de pseudoartrose hipertrófica, Iwakura e colaboradores (2009) isolaram células aderentes, com morfologia fibroblastóide e expressão dos antígenos CD105 e CD90. Além disso, verificaram que após indução com substâncias específicas, as células foram capazes de se diferenciar para as vias osteogênica, condrogênica e adipogênica. Dessa forma, concluíram que o tecido de pseudoartrose hipertrófica seria um reservatório de células mesenquimais, com capacidade normal de gerar osso.

Neste mesmo ano, Bajada e colaboradores (2009) examinaram o foco de pseudoartrose atrófica e também relataram o isolamento de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e expressando de CD105. Analisando a capacidade proliferativa e o potencial de diferenciação *in vitro* das células do tecido de não-união (NUSC, *nonunion stromal cells*) em comparação com BMSC isoladas da crista ilíaca de pacientes submetidos a cirurgia de fusão vertebral, verificaram que as NUSC foram capazes de diferenciar para as três linhagens mesenquimais. Porém, em comparação com as BMSC, apresentaram uma menor capacidade de mineralização.

Ambos os estudos (IWAKURA *et al.*, 2009; BAJADA *et al.*, 2009) além de não terem investigado a expressão de CD146 nas células do foco de pseudoartrose, utilizaram o método de indução *in vitro* a partir de tratamento com coquetéis indutores, para avaliar a capacidade de diferenciação das células. Embora seja amplamente utilizado na literatura, reconhece-se que este método é artificial e suscetível a gerar falsos resultados, uma vez que a alta concentração de seus fatores é capaz de promover a reprogramação das células (BIANCO *et al.*, 2013; ROBEY *et al.*, 2014). A metodologia padrão para avaliar a verdadeira capacidade de diferenciação de uma população de células do estroma da medula é o transplante

heterotópico *in vivo*. Como não há fatores indutores externos, os tecidos gerados por essas células nessas condições representam a real expressão de seu potencial e não uma capacidade induzida (BIANCO *et al.*, 2010; BIANCO *et al.*, 2013).

Considerando que as células multipotentes da medula, as SSC, residem na subpopulação CD146⁺ (SACCHETTI *et al.*, 2007), avaliar a sua expressão é essencial para a determinação do estágio de comprometimento dessas células na hierarquia do processo de diferenciação e, dessa forma, aprofundar os conhecimentos sobre em que momento ocorreu a sua interrupção.

Portanto, a literatura vigente ainda não permite concluir se as células presentes no foco fraturário são intrinsicamente capazes de formar osso no ambiente *in vivo* e se, confirmado este potencial, a falha da consolidação seria decorrente de disfunções na sinalização no microambiente da fratura, que levariam as células a entrarem em um estado quiescente, interrompendo o processo de formação óssea. Um melhor conhecimento dos progenitores osteogênicos presentes na medula óssea e no tecido do foco fraturário de pacientes com pseudoartrose é fundamental para o entendimento da fisiopatologia da doença para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência de progenitores mesenquimais na medula óssea de pacientes com pseudoartrose e verificar a associação das células presentes no tecido do foco fraturário ao sistema estromal e sua capacidade de formação óssea *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a eficiência de formação de colônias e o potencial clonogênico de progenitores mesenquimais isolados da medula óssea da crista ilíaca;
2. Caracterizar, por citometria de fluxo, o perfil imunofenotípico das células do foco de pseudoartrose em comparação à células mesenquimais do estroma da medula e osteoblastos;
3. Analisar a atividade proliferativa e o grau de senescência *in vitro* das células do foco de pseudoartrose;
4. Avaliar o potencial de diferenciação *in vitro* das células do foco de pseudoartrose para as vias adipogênica e osteogênica;
5. Avaliar a capacidade de formação de osso heterotópico através do transplante *in vivo* de células do foco de pseudoartrose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes e coleta de amostras teciduais

Foram incluídos neste estudo pacientes de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos, portadores de fraturas diafisárias de ossos longos que evoluíram para pseudoartrose hipertrófica ou atrófica, operados no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO/MS) a partir de junho de 2013. Foram excluídos do estudo os pacientes com infecção óssea no local da lesão em qualquer momento do tratamento anterior à abordagem cirúrgica feita pela equipe do INTO, assim como infecções sistêmicas de outra natureza, portadores de discrasias sanguíneas, doenças hematológicas graves, neoplasias malignas exceto carcinoma basocelular, diabetes descompensada, icterícia, alcoolismo e pacientes em uso de terapia imunossupressora.

3.2 Diagnóstico de pseudartrose

A pseudoartrose foi definida como a “não consolidação óssea após um período mínimo de nove meses da fratura inicial”. O diagnóstico foi estabelecido em duas radiografias ortogonais consecutivas, com intervalo mínimo de três meses (FROLKE e PATKA, 2007), em pacientes com quadro clínico de incapacidade de apoio de carga no membro afetado. A não consolidação foi definida com base no escore RUST, descrito para fraturas diafisárias tibiais (EBRAHEIM *et al.*, 1991; KOOISTRA *et al.*, 2010), onde avalia-se a presença de ponte óssea e de linha de fratura visível nas projeções em anteroposterior e perfil do segmento ósseo (Anexo 1). Os pacientes com escores abaixo de sete pontos foram diagnosticados com

pseudoartrose. Todos os pacientes tiveram ficha de identificação (Anexo 2) preenchida e foram estratificados segundo o escore para pseudoartrose descrito por Calori e colaboradores (2007) (Anexo 3).

3.3 Coleta de amostras teciduais

A coleta das amostras teciduais ocorreu no momento da cirurgia para tratamento da pseudoartrose (Fig.3). Pela via de acesso utilizada no procedimento principal, foi ressecado todo o tecido fibroso que se encontrava interposto no foco de fratura (Fig. 3A), até a exposição completa dos bordos ósseos fraturários. Em seguida foram colhidos fragmentos ósseos com ajuda de uma goiva, dos bordos de cada lado da fratura, variando num total de 2 a 3 fragmentos de cada bordo com volume de cerca de 1cm^3 (Fig. 3D). Todos os pacientes foram tratados com enxertia óssea autóloga no foco, sendo o sítio doador a porção anterior da crista ilíaca. Os fragmentos ósseos esponjosos foram retirados deste sítio segundo técnica padrão com uso de curetas e, dois a três dos fragmentos retirados com volume de cerca de 0.125 cm^3 (cuboidais com 0.5cm de lado) semelhante ao dos fragmentos ósseos do foco, foram enviados para o isolamento celular (Fig. 3C). As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis mantidos a 4°C e encaminhadas imediatamente para o Centro de Tecnologia Celular (CTC) do INTO, onde foram processadas.

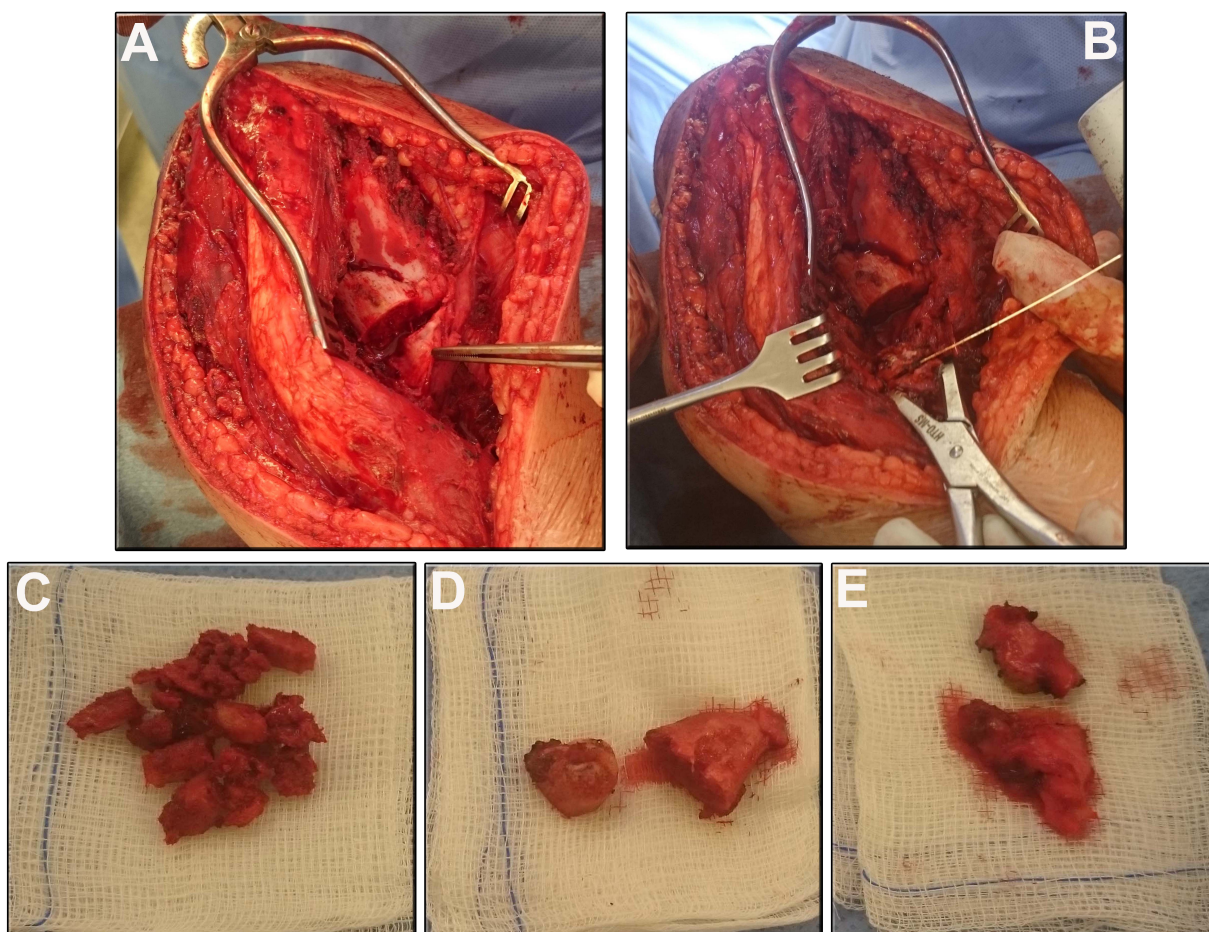


Figura 3. Coleta e aspecto macroscópico das amostras teciduais. (A) Retirada de fragmento do tecido fibroso de pseudoartrose atrófica diafisária de úmero. (B) Retirada de fragmento ósseo dos bordos da fratura. (C) Osso esponjoso obtido da crista ilíaca para enxertia. (D) Osso cortical. (E) Tecido fibroso do foco de pseudoartrose.

3.4 Aspectos éticos

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO (CEP nº 476.062, ANEXO 4). Os pacientes foram esclarecidos sobre os procedimentos e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (anexo 5).

3.5 Isolamento de células mesenquimais do estroma da medula óssea (BMSC)

Os fragmentos de tecido ósseo esponjoso da crista ilíaca foram lavados com solução salina tamponada (PBS, *phosphate buffer saline*) para dissociação da medula óssea. A suspensão celular obtida foi distribuída na densidade de $8,0 \times 10^3$ células nucleadas/cm² em DMEM (*Dulbecco's Modified Essential Medium-Low Glucose*, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e antibióticos (penicilina G sódica 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por três dias. Após este período, as células não aderentes foram removidas através de lavagem com PBS, o meio de cultura foi trocado e as células aderentes foram mantidas por 14 dias, quando foram removidas com solução de tripsina 0,125% EDTA 0,78mM e expandidas até a terceira passagem.

3.6 Ensaio de eficiência de formação de colônias – CFE

Após obtenção da suspensão celular de medula óssea conforme descrito acima, 2×10^5 células nucleadas foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² em 5 mL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, a 37°C com 5% de CO₂. Após 14 dias, as colônias foram fixadas com solução de formol a 10% e coradas com solução aquosa saturada de cristal violeta. Após secagem à temperatura ambiente (TA), realizou-se a contagem das colônias e a medição dos seus diâmetros. Colônias com menos de 50 células não foram consideradas na quantificação.

3.7 Isolamento de células do foco de pseudoartrose (NUSC) e do tecido ósseo (HOB)

Os tecidos do foco de pseudoartrose e ósseo foram lavados com PBS, picotados em pequenos fragmentos e incubados em solução de colagenase a 1% (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) por 40 minutos a 37°C. Após este período, as células obtidas foram centrifugadas a 300x *g* por 10 minutos e ressuspensas em DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos. Os tecidos foram lavados e reincubados com solução de colagenase por mais 40 minutos. As células obtidas foram processadas como descrito. As duas baterias celulares foram misturadas e 1,0x10⁶ células foram cultivadas em garrafas de 75cm² até atingirem cerca de 70% de confluência, quando foram removidas com solução de tripsina 0,125% EDTA 0,78mM e expandidas até a terceira passagem.

3.8 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Um total de 1,0x10⁶ células foram incubadas por 30 minutos, à TA, com os anticorpos anti-CD105 conjugado a FITC, anti-CD90 conjugado a Percp-Cy5.5, anti-CD73 conjugado a APC (todos da BD Biosciences, New Jersey, USA) e anti-CD146 conjugado a PE (Biolegend, San Diego, CA, USA). A imunoreatividade para cada marcador CD (*cluster of differentiation*) foi avaliada usando o citômetro de fluxo BD Accuri equipado com o software de análise BD CSampler™ (BD Biosciences).

3.9 Análise de duplicação populacional

Durante a fase de expansão *in vitro*, ao fim de cada passagem, calculou-se, o número de duplicações populacionais (PD, *population doubling*) efetuadas naquele

período, através da seguinte fórmula: $PD = (\text{Log}_{10} N_f - \text{Log}_{10} N_i) / \text{Log}_{10} 2$, onde N_f é o número final de células obtidas e N_i é o número inicial de células cultivadas (Iwakura et al, 2009). Ao fim da terceira passagem (término da expansão), o número total de duplicações populacionais (cPD, *cumulative population doubling*) foi calculado através do somatório da quantidade de PD realizadas a cada passagem ($cPD = PD_1 + PD_2 + PD_3$). O cálculo do tempo necessário para a realização de um ciclo duplicação (T_{PD}) foi feito através da fórmula: $T_{PD} = \Delta t_e / cPD$, onde Δt_e é o intervalo de tempo, em dias, do início ao fim do período de expansão celular.

3.10 Análise de senescência

O percentual de células senescentes ao fim da expansão foi avaliado através do ensaio de atividade de β -galactosidase detectável em pH 6.0. As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% em PBS por 10 min a TA, seguido por duas lavagens em PBS. Imediatamente, as células foram incubadas com solução contendo 1 mg/mL de X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside*, Sigma), 5 mM de ferrocianeto de potássio, 2 mM de cloreto de magnésio e 150 mM de cloreto de sódio em tampão de ácido cítrico 0,2 M /fosfato de sódio 0,06 M por 24 horas a 37°C. As quantificações foram realizadas em fotografias de 15 campos aleatórios obtidas com microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon). As células apresentando pigmentação azulada foram consideradas senescentes. O número (em percentual) de células senescentes foi expresso em função do número total de duplicações populacionais (cPD) de cada linhagem celular.

3.11 Diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*

As células (BMSC, NUSC e HOB) foram distribuídas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/cm² e incubadas em meio de expansão (DMEM contendo 10% SFB e antibióticos) até atingirem 100% de confluência. A diferenciação osteogênica foi induzida com DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos, contendo 10mM de β -glicerofosfato, 5 μ g/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e 10^{-6} M de dexametasona (todos da Sigma) por 21 dias, com troca de meio a cada dois a três dias. Os controles foram mantidos em meio de expansão. Para diferenciação adipogênica, as células foram incubadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos, contendo 0,5mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 10^{-6} M de dexametasona, 200mM de indometacina (todos da Sigma) e 10mM de insulina (Humulin®, Lilly, São Paulo, SP, Brasil) por 21 dias.

A diferenciação osteogênica foi avaliada pela quantificação de focos de mineralização, evidenciados pela coloração de Von Kossa. As monocamadas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 1h a TA e incubadas com solução de nitrato de prata a 2% em água destilada por 1h, protegido da luz. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com água destilada, para retirar o excesso de corante e expostas à luz ultravioleta por 10 minutos. Quinze campos aleatórios foram fotografados usando microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera digital Nikon Digital Sight DS-U3 (Nikon). As áreas de impregnação pela prata foram quantificadas com o programa NIH Image J e representadas como percentual da área total.

A diferenciação adipogênica foi avaliada pela coloração de Oil Red O. As monocamadas foram incubadas em propilenoglicol P.A. por 2 minutos e, em seguida, com o corante Oil Red O a 0,5% em propilenoglicol, por 20 minutos a TA.

As monocamadas foram lavadas com solução de propilenoglicol 85% em água destilada por um minuto e duas vezes com água destilada.

3.12 Avaliação *in vivo* do potencial osteogênico das NUSC

Para avaliar o potencial de formação óssea *in vivo*, $1,0 \times 10^6$ NUSC isoladas de três diferentes doadores foram incubadas *overnight* a 37°C, em duplicatas, com 30mg de pó de hidroxiapatita/tricalciofosfato (HA/TCP, Osteoset® T, Wright Medical, Arlington, TN) em 1mL de DMEM contendo 10% de SFB e antibióticos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 15µL de fibrinogênio humano a 3,2 mg/mL em PBS e 15µL de trombina humana a 100 U/mL em solução 0,1% w/v de albumina bovina (BSA), ambos adquiridos junto à Sigma. Após 30 min, os implantes foram coletados com auxílio de uma cureta e introduzidos no subcutâneo do dorso de dois camundongos distintos (replicatas) da linhagem BALB/c nu/nu bege, com idade entre 6-8 semanas. As cirurgias foram realizadas sob anestesia geral obtida através de injeção intraperitoneal de 80-100mg/kg de hidrocloreto de quetamina e 10mg/kg de xilazina. Após 12 semanas, os animais foram eutanasiados por anestesia profunda e os implantes foram coletados para análise histológica. Após fixação por 24 horas em solução de formol tamponado a 10%, os implantes foram descalcificados por 2 horas em solução de ácido nítrico, e incluídos em parafina. Foram realizados cortes com 6µm de espessura, corados posteriormente pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do INTO.

3.13 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa Graphpad Prism versão cinco. Os resultados de pelo menos três experimentos independentes foram comparados pelo teste *t* de Student ou por ANOVA *One Way*. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Dada a variabilidade intrínseca de amostras humanas, as análises foram realizadas dentro de um intervalo de confiança de 90%. Dessa forma, valores de $p < 0,1$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Características dos doadores

As características clínicas e demográficas dos doadores das amostras teciduais estão relacionadas na tabela 1.

Foram obtidas amostras de 19 pacientes, sendo 13 (68%) do gênero masculino e seis (32%) do gênero feminino. Destes, quatro (21%) apresentavam pseudoartrose hipertrófica, e 15 (79%) pseudoartrose atrófica. A média de idade dos pacientes foi de 45,94 anos (variação de 22 a 65 anos), e o tempo médio decorrido desde a fratura até o procedimento para tratamento da pseudoartrose foi de 53,57 meses (variação de 9 a 360 meses).

Três pacientes tinham histórico de tabagismo (16%), e quatro apresentavam comorbidades, sendo dois portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS), um paciente com combinação de HAS com Diabetes Mellitus (DM), um paciente portador de hipotireoidismo e um paciente apresentava drogadição para cocaína. Em sete dos pacientes selecionados, as amostras teciduais não tinham quantidade suficiente de células para as análises experimentais.

Os segmentos acometidos foram, por ordem de frequência, o úmero (n=7), o fêmur (n=6), a tíbia (n=5) e ulna (n=1). O escore de Calori variou entre 4 e 23 pontos, e o escore RUST variou entre 4 a 6 pontos.

Paciente	Idade	Genêro	Local	Tempo de fratura meses	Tipo	Escore de Calori	Escore de RUST	Comorbidades
1	31	M	tíbia	30	Atrófica	9	4	Não
2	57	F	úmero	22	Atrófica	8	4	Não
3	42	M	úmero	20	Atrófica	12	5	Não
4	58	F	úmero	9	Atrófica	10	4	Hipotire- oidismo
5	65	F	fêmur	36	Atrófica	20	4	Não
6	52	M	tíbia	24	Atrófica	12	5	HAS
7	25	M	fêmur	24	Atrófica	23	5	Não
8	34	F	úmero	32	Atrófica	12	4	HAS, DM
9*	49	F	ulna	18	Atrófica	16	6	Não
10*	31	M	úmero	120	Atrófica	13	4	Não
11*	64	F	fêmur	48	Atrófica	10	6	Não
12*	49	M	tíbia	24	Atrófica	12	4	Não
13*	54	M	fêmur	13	Atrófica	18	6	Não
14*	37	M	úmero	32	Atrófica	11	4	Não
15*	48	M	úmero	63	Atrófica	15	7	Não
16	22	M	tíbia	11	Hipertrófica	11	7	Não
17	35	M	fêmur	48	Hipertrófica	15	7	Drogadi- ção
18	65	M	fêmur	84	Hipertrófica	17	7	HAS
19	55	M	tíbia	360	Hipertrófica	4	6	Não

Tabela 1. Características dos doadores das amostras teciduais. (HAS – Hipertensão arterial sistêmica, DM – Diabetes Mellitus) * Amostras com número insuficiente de células.

4.2 Frequência e potencial clonogênico de progenitores mesenquimais na medula óssea

Com o intuito de determinar a frequência de células progenitoras mesenquimais na medula óssea de pacientes com pseudoartrose, realizou-se o ensaio de eficiência de formação de colônias (CFE) nas amostras teciduais obtidas da crista ilíaca. A morfologia das células com característica fibroblastóide, assim como o diâmetro das colônias (atróficas, $0,36 \pm 0,05$ cm; hipertróficas, $0,34 \pm 0,05$

cm) foram similares nos dois tipos de pseudoartrose (Fig. 4, A-E), indicando não haver diferenças em relação ao potencial clonogênico dos progenitores mesenquimais isolados de cada grupo. Em relação ao número de colônias obtidas, pacientes com pseudoartrose hipertrófica apresentaram média de $13,27 \pm 2,1$ CFU-F (variação de 9,62 a 16,33; n=4; Tabela 2a). No grupo de pseudoartrose atrófica observou-se uma maior variabilidade na frequência de CFU-F (variação de 3,9 a 35,3; n=8; Tabela 2b). Dois pacientes apresentaram um número significativamente mais alto de CFU-F (35,3 e 22,2) que a média dos demais pacientes ($8,13 \pm 3,36$; n=6). Com exceção destes dois casos, o número médio de colônias obtidas a partir da medula óssea de pacientes com pseudoartrose atrófica mostrou-se significativamente menor do que em pacientes com pseudoartrose hipertrófica (Fig. 4F e Tabela 2a).

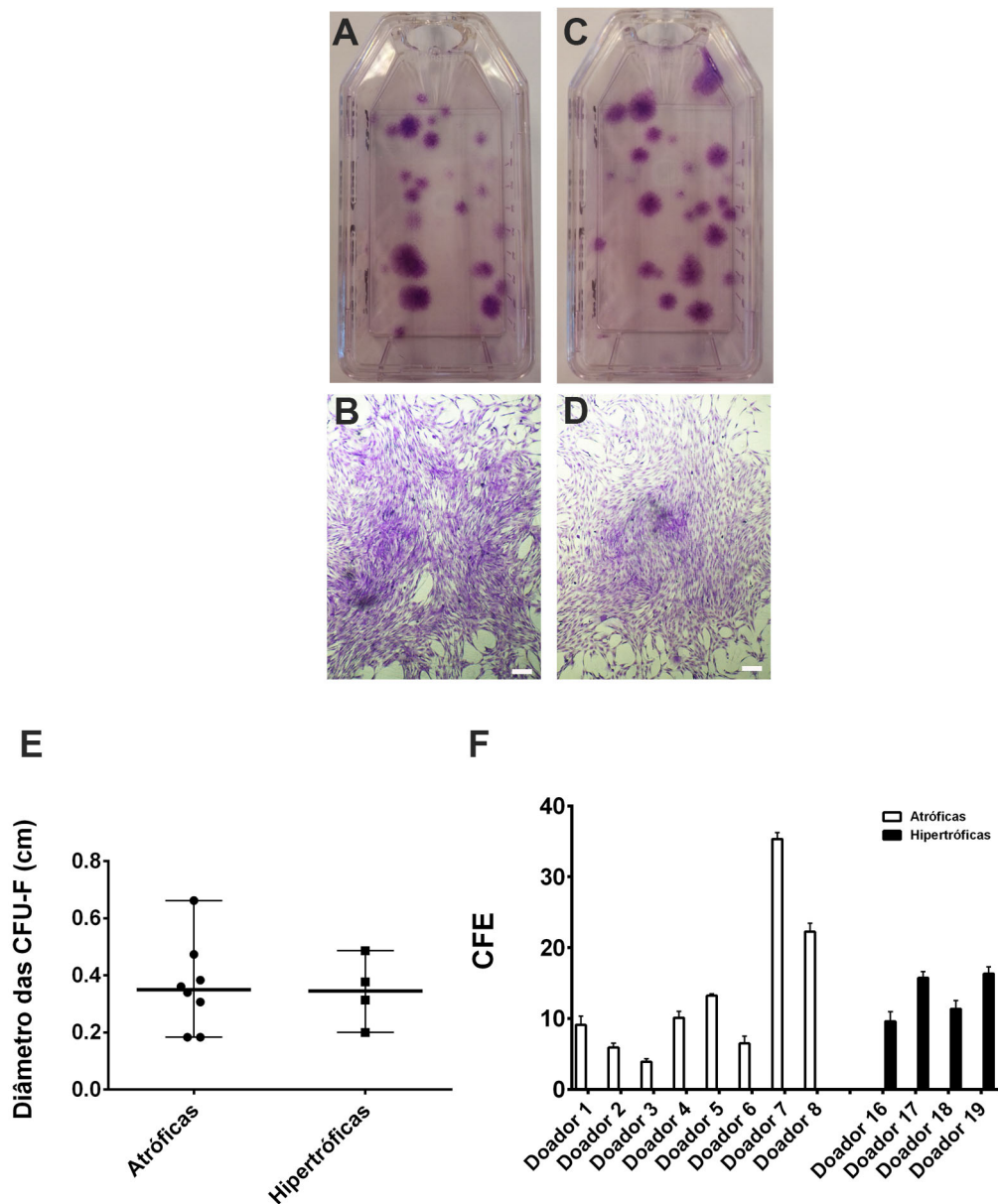


Figura 4. Ensaio de Unidades formadoras de colônias fibroblastóides. (A-D) Imagens representativas de CFU-F de pacientes com pseudoartrose atrófica (A, visão macroscópica; B, 4x) e hipertrófica (C, visão macroscópica; D, 4x) coradas com cristal violeta. Barra de escala = 200µm. (E) Medição do diâmetro das colônias. Pontos representam os valores de distintos pacientes. Barras representam a média. $p=0,849$. (F) Número de CFU-Fs de cada paciente. Dados representam a média $\pm$ DP de quadruplicatas.

Tabela 2a. CFE de pacientes com pseudoartrose hipertrófica.

Doador	CFE	Idade
16	9,62	22
17	15,7	35
18	11,37	65
19	16,33	55
Media ± DP	13,27 ± 2,1	44,25 ± 16,7

Tabela 2b. CFE de pacientes com pseudoartrose atrófica.

Doador	CFE	Idade
1	5,9	31
2	3,9	57
3	10,12	42
4	9,12	58
5	13,2	65
6	6,5	52
7	22,2	25
8	35,3	34
Media doadores 1-8	13,2 ± 10,5	45,5 ± 12,8
Media doadores 1-6	*8,13 ± 3,36	50,8 ± 11,2

*p<0.05, em relação ao grupo de pseudoartrose hipertrófica (Tab.2)

4.3 Caracterização morfológica e imunofenotípica das células do foco de pseudoartrose

Com o intuito de determinar a identidade e as propriedades das células presentes no foco de pseudoartrose, primeiramente avaliamos suas características

após isolamento *in vitro*. BMSC e osteoblastos (HOB, *human osteoblasts*) foram utilizados como parâmetro, uma vez que pertencem ao sistema estromal da medula óssea, suas características *in vitro* são conhecidas e representam extremos opostos na progressão de diferenciação. A partir da digestão dos tecidos do foco de pseudoartrose, células, com morfologia fibroblastóide, similar às BMSC e HOB, foram isoladas (Fig. 5). Como forma de identificação, a nomenclatura *Nonunion stromal cell* (NUSC) foi adotada e utilizada subsequentemente neste estudo.

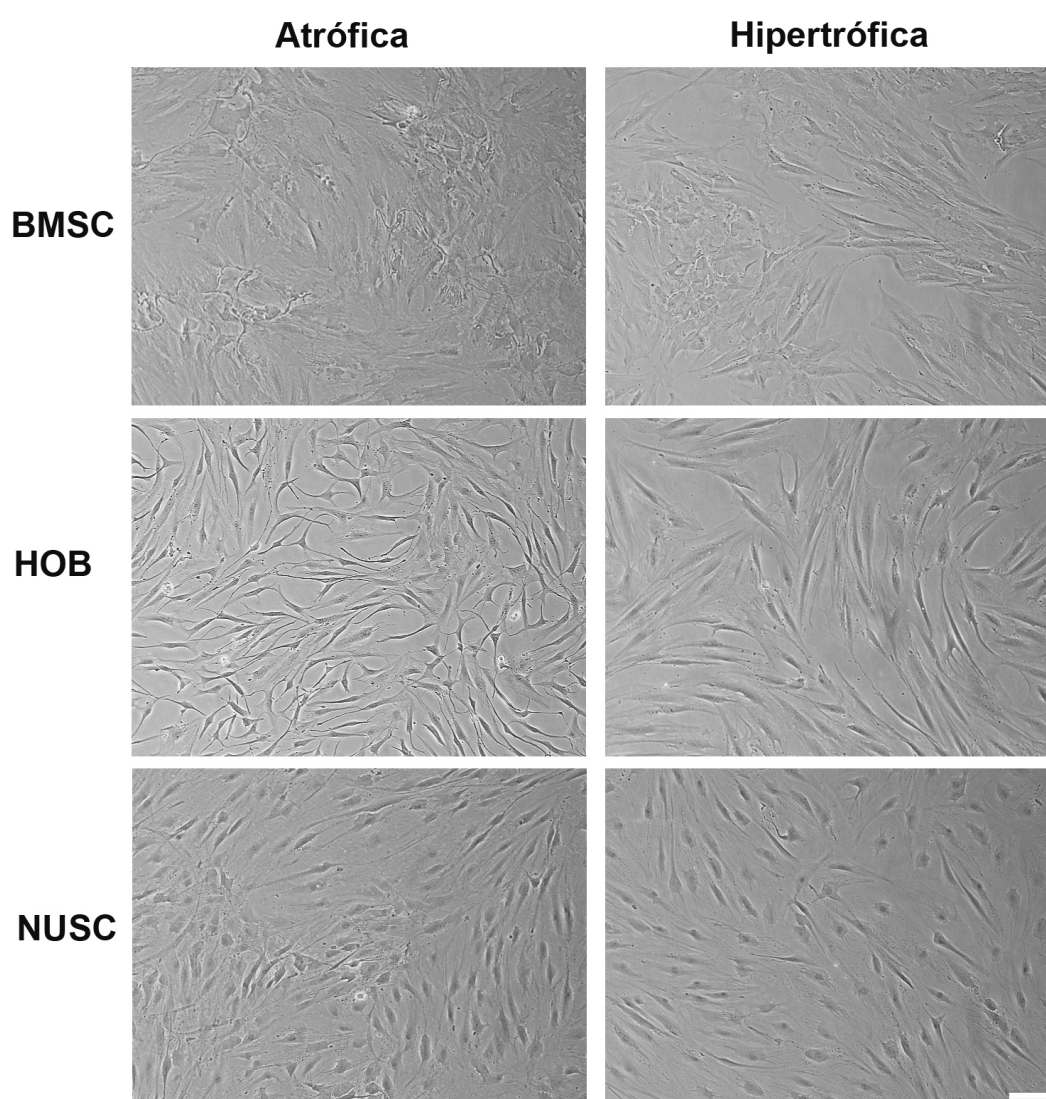


Figura 5. Aspecto morfológico das células após expansão *in vitro*. Fotomicrografia de contraste de fase da *expansão in vitro* das BMSC, HOB e NUSC isoladas da crista ilíaca, de osso cortical e do tecido fibroso do foco fraturário, respectivamente, de indivíduos com pseudoartrose atrófica e hipertrófica. Barra de escala = 100µm.

Através de imunofenotipagem por citometria de fluxo verificou-se que todas as populações de NUSC, tanto atróficas como hipertróficas, expressavam as proteínas de superfície CD90, CD73, CD105 e CD146, porém em proporções distintas em relação a BMSC e HOB (Fig. 6 e 7).

Nas NUSC atróficas, CD90 e CD73 foram observados em aproximadamente 100% das células. No entanto, o percentual de células CD105⁺ foi significativamente menor (média $\pm$ DP; 13,56 $\pm$ 8,8) que o observado em BMSC (média $\pm$ DP; 50,26 $\pm$ 21,64) (Fig. 6). De forma similar, CD146 foi observado em apenas 2,12% $\pm$ 2,9 das células, enquanto nas BMSC esta proporção foi de 55,59% $\pm$ 39,81 (Fig. 6). Em comparação aos HOB, a proporção de CD105 e CD146 nas NUSC atróficas foi menor, porém sem significância estatística (Fig.7).

Nas NUSC hipertróficas, foram observadas diferenças somente em relação à expressão de CD146, que foi detectado em 4,54% $\pm$ 4,44 das células, enquanto nas BMSC esta proporção foi de 32,58% $\pm$ 23,21. A proporção de células expressando CD105, CD90 e CD73 foi similar nos três tipos celulares (Fig.6 e 7).

Dessa forma, concluímos que as NUSC possuem perfil imunofenotípico característico de células do compartimento estromal da medula óssea. No entanto, a composição da população foi mais similar às HOB do que às BMSC.

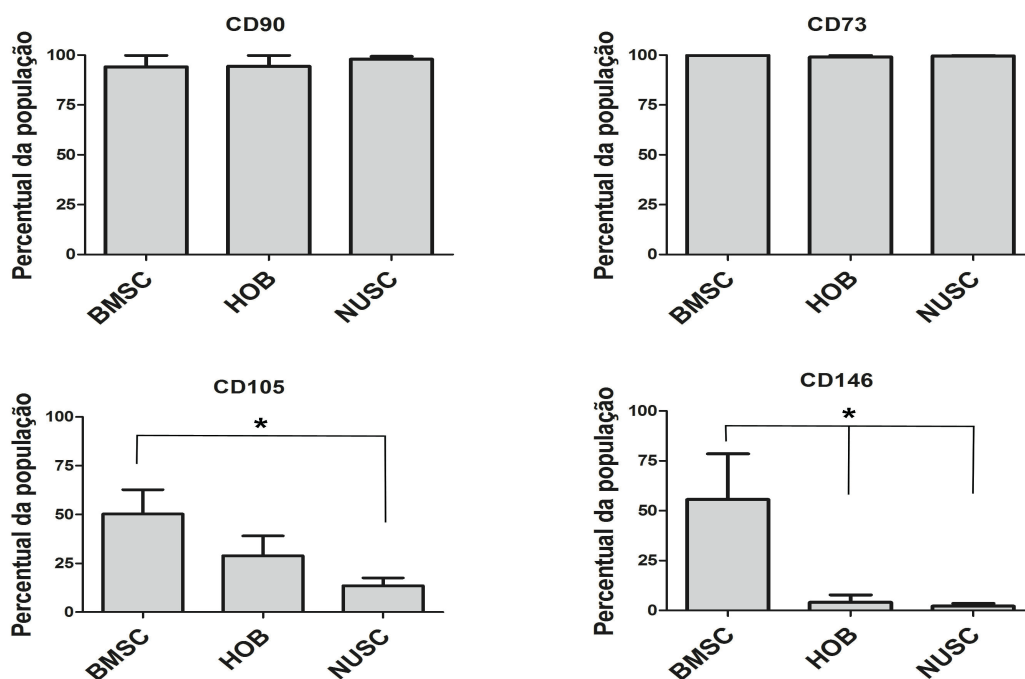
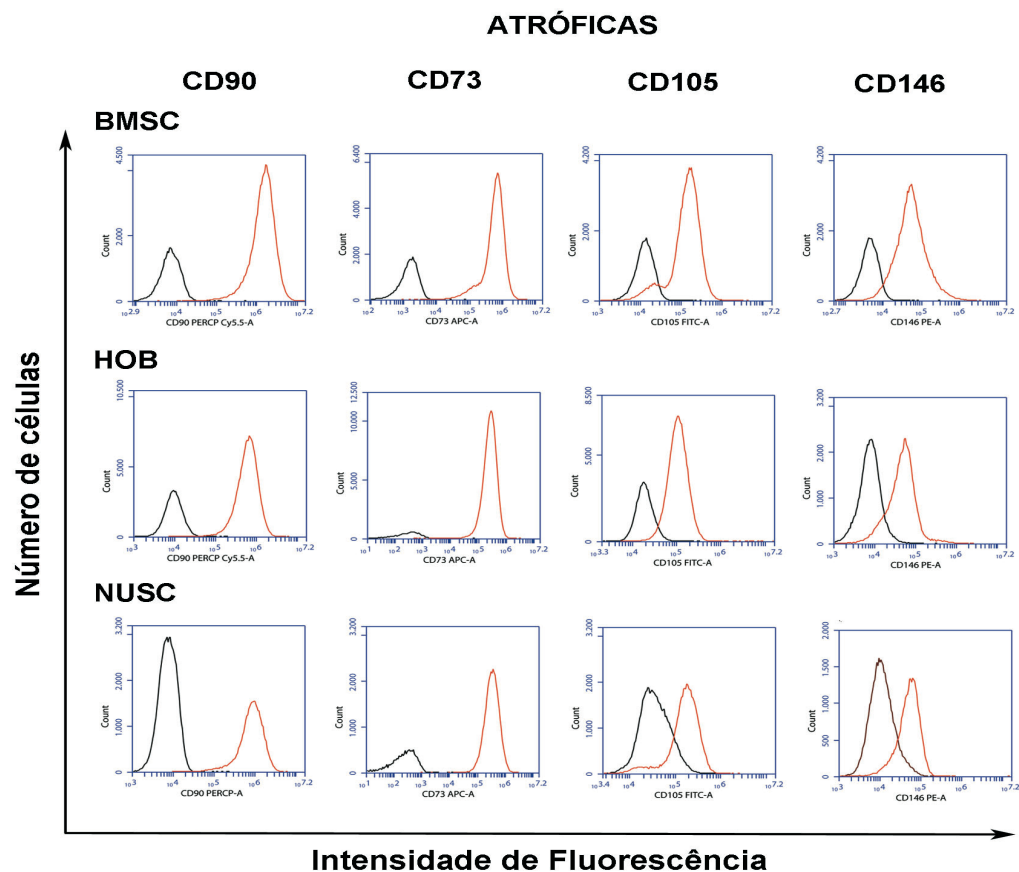


Figura 6. Caracterização do perfil imunofenotípico das células isoladas de focos de pseudoartrose atrófica. Histogramas mostram a expressão (curvas em vermelho) das proteínas de superfície CD90, CD73, CD105 e CD146 nos três tipos celulares em comparação aos controles (curvas em preto). Barras representam média $\pm$ DP do percentual de células positivas para cada marcador CD. BMSC, n = 3; HOB, n = 3; NUSC, n = 5. * $p=0,03$.

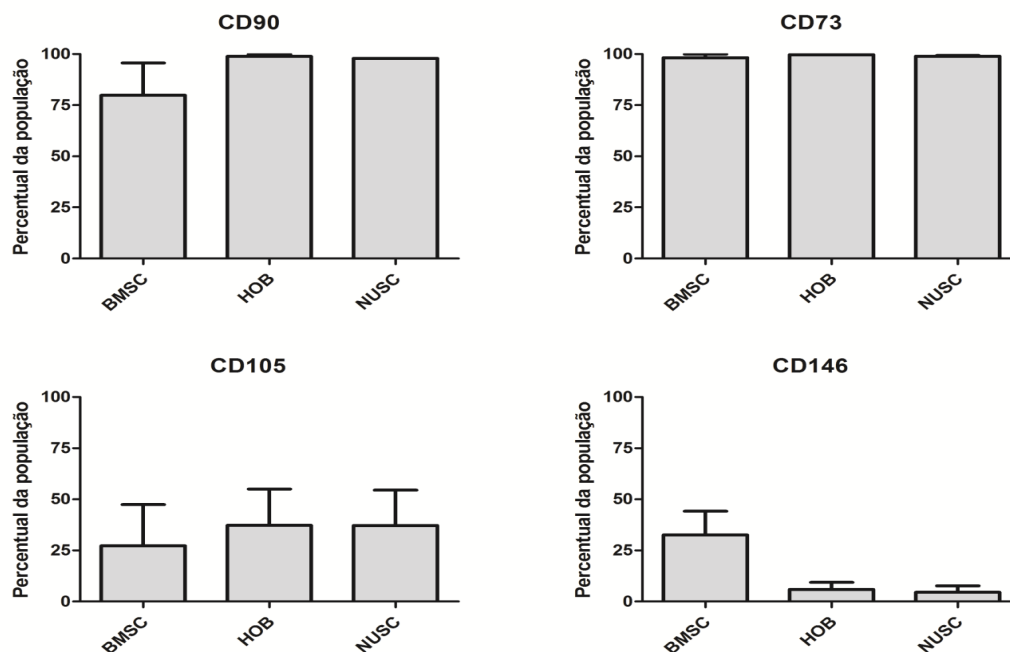
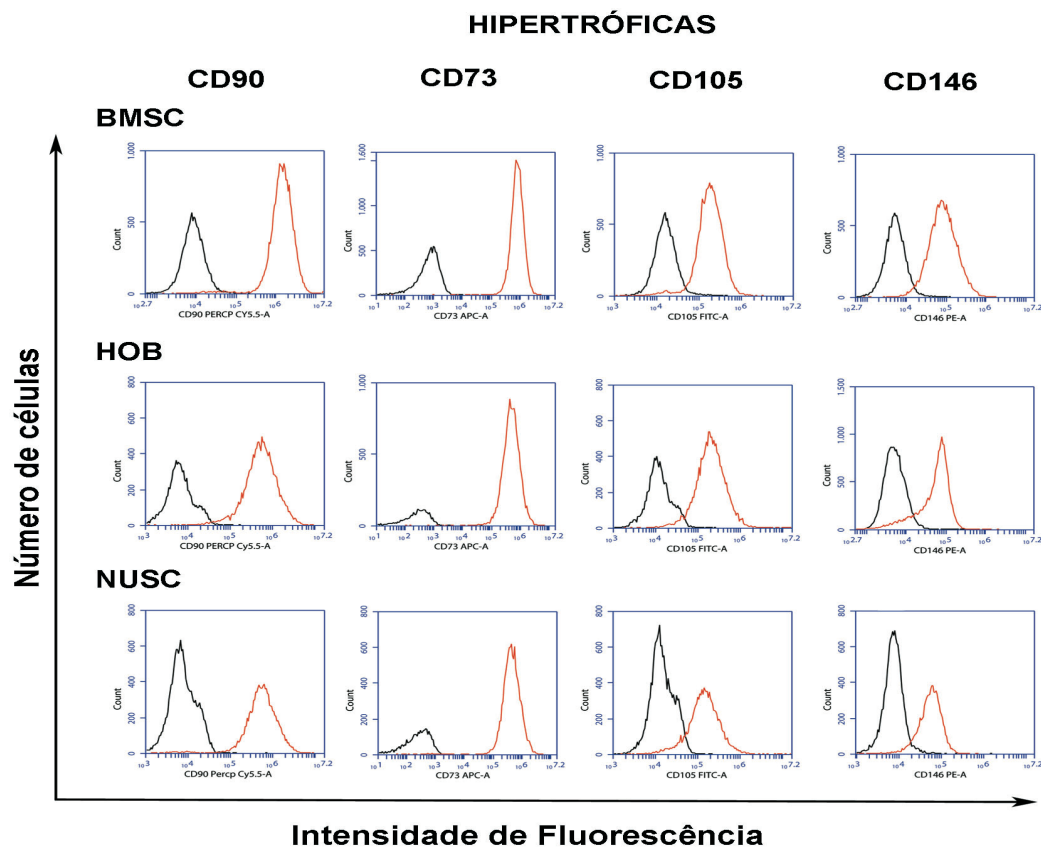


Figura 7. Perfil imunofenotípico de BMSC, HOB e NUSC isoladas de pacientes com pseudoartrose hipertrófica. Histogramas mostram a expressão (curvas em vermelho) das proteínas de superfície CD90, CD73, CD105 e CD146 nos três tipos celulares em comparação aos controles (curvas em preto). Quantificação do percentual celular expressando CD90, CD73, CD105 e CD146 em culturas de BMSC, HOB e NUSC de pseudoartrose hipertrófica. Barras representam a média $\pm$ DP do percentual de células positivas para cada marcador CD. BMSC, n = 4; HOB, n = 4; NUSC, n = 2.

4.4 Análise da atividade proliferativa e do grau de senescência *in vitro* de BMSC, HOB e NUSC

A fim de avaliar o comportamento *in vitro* das NUSC, avaliamos o número total de duplicações populacionais (cPD, *cumulative population doubling*) realizadas ao termino do processo de expansão . As culturas de NUSC, de ambos tipos de pseudoartrose apresentaram um número tendencialmente menor de duplicações em relação às de BMSC e HOB (Fig. 8 A-B; Tab. 3), diretamente relacionado a um tempo aumentado do ciclo de duplicação (T_{pd} , *time for population doubling*) (Fig. 8 C-D; Tab. 3).

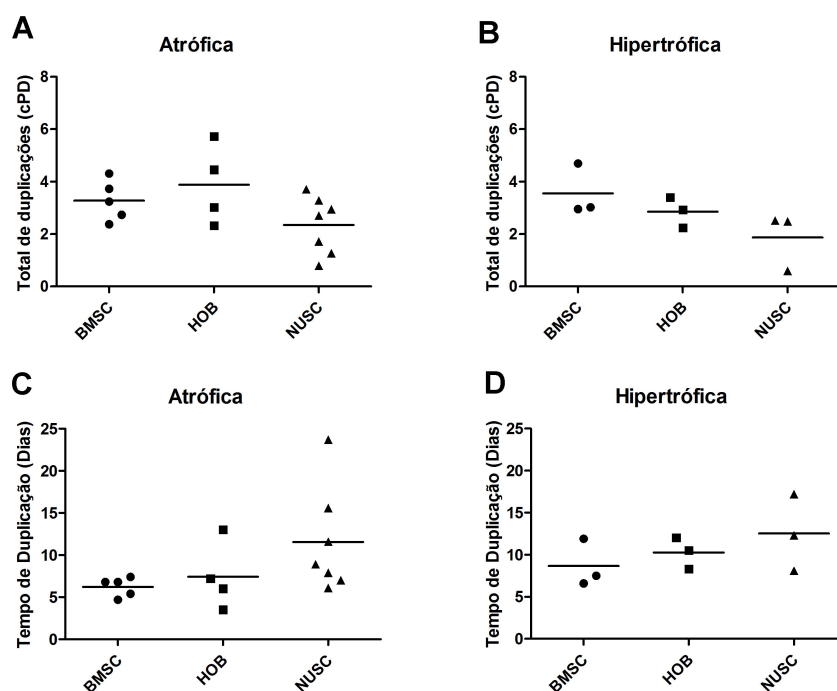


Figura 8. Ensaio para avaliação do tempo de duplicação celular. Quantificação do total de duplicações populacionais (cPD) (A-B) e do tempo de duplicação (T_{pd}) (C-D) *in vitro* de BMSC, HOB e NUSC. Pontos representam os valores individuais das diferentes populações celulares testadas. Barras representam a média. Grupo atrófica: BMSC, n = 5; HOB, n = 4; NUSC, n = 7. Grupo hipertrófica: BMSC, n = 3; HOB, n = 3; NUSC, n = 3.

Tabela 3. Tempo e total de duplicações populacionais.

	cPD		T _{pd}	
	Atróficas (Média ± DP)	Hipertróficas (Média ± DP)	Atróficas (Média ± DP)	Hipertróficas (Média ± DP)
BMSC	3,27 ± 0,76	3,55 ± 0,98	5,63 ± 1,75	8,66 ± 2,83
HOB	3,88 ± 1,51	2,85 ± 0,57	9,03 ± 5,19	10,27 ± 1,86
NUSC	2,34 ± 1,09	1,86 ± 1,09	11,54 ± 6,25	12,53 ± 4,55
Valor de p	#0,116	#0,15	#0,127	0,40

cPD, total de duplicações celulares; T_{pd}, tempo de duplicação populacional; #, *p* valor limítrofe

No entanto, não observamos diferença no percentual de células senescentes, em comparação às culturas de BMSC e HOB (Fig. 9).

Estes resultados sugerem que, embora as NUSC possuam uma propensão a apresentarem ciclos de proliferação mais lentos, esta característica não está relacionada à entrada em estado de senescência.

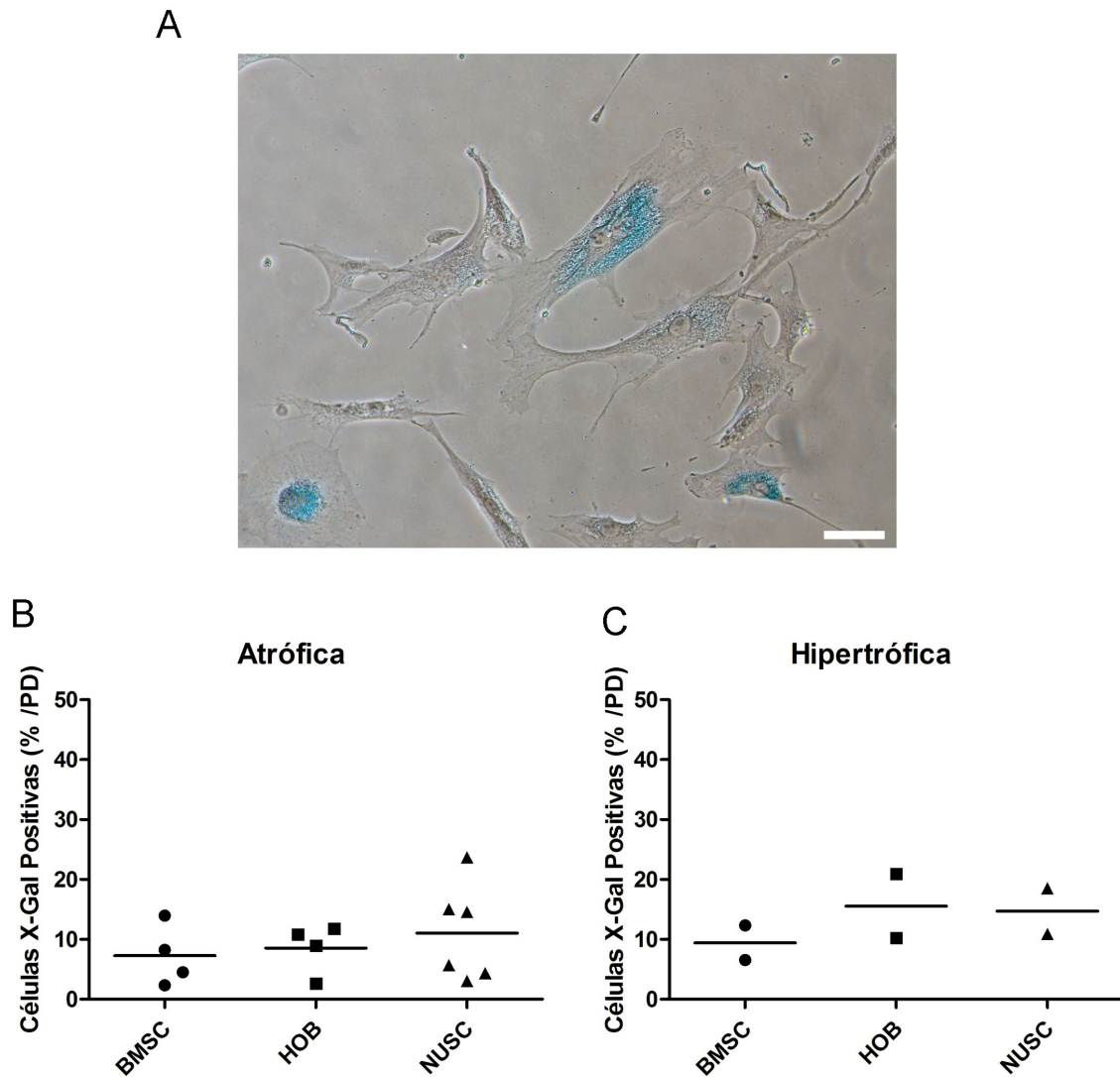


Figura 9. Ensaio in vitro de senescência celular (A) Micrografia de contraste de fase representativa de células X-Gal positivas (coloração azul). Barra de escala = 100 μ m. (B-C) Quantificação do percentual de células X-Gal positivas por ciclo de duplicação populacional (PD). Pontos representam os valores individuais das diferentes populações celulares testadas. Barras representam a média. Grupo atrófica: BMSC, n = 4; HOB, n = 4; NUSC, n = 6; $p=0,64$. Grupo hipertrófica: BMSC, n = 2; HOB, n = 2; NUSC, n = 2; $p=0,58$.

4.5 Avaliação do potencial de diferenciação *in vitro* de BMSC, HOB e NUSC

Para confirmar a associação das NUSC ao sistema estromal da medula óssea, avaliamos seu potencial de diferenciação *in vitro* para as vias adipogênica e osteogênica. Verificou-se que tanto as NUSC atróficas como hipertróficas diferenciaram para a via adipogênica, conforme observado pelo acúmulo lipídico intracitoplasmático evidenciado pela coloração de Oil Red O. (Fig. 10).

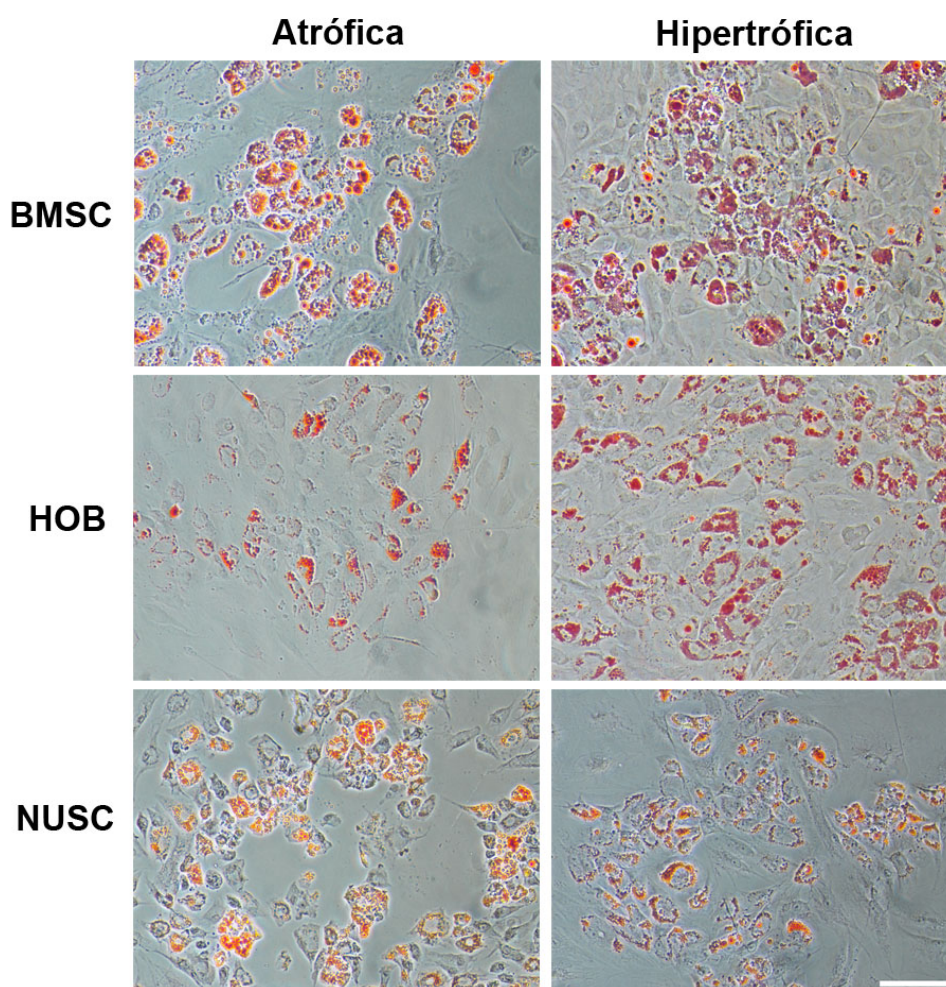


Figura 10. Avaliação do potencial *in vitro* de diferenciação adipogênica das células isoladas do foco de pseudoartrose. Diferenciação adipogênica *in vitro*. BMSC, HOB e NUSC isoladas de pseudoartrose atrófica e hipertrófica foram tratadas com coquetel adipogênico por 21 dias e coradas com Oil Red O. Vacúlos lipídicos apresentam coloração vermelho-alaranjada. Barra de escala = 100µm.

Após tratamento com coquetel osteoindutor, todas as NUSC isoladas foram capazes de depositar matriz mineralizada rica em cálcio, de forma comparável a BMSC e HOB (Fig. 11). Em conjunto, estes resultados indicam que as NUSC pertencem à classe de progenitores mesenquimais do sistema estromal da medula óssea, com potencial de diferenciação semelhante a células isoladas de sítios não comprometidos por processos patológicos.

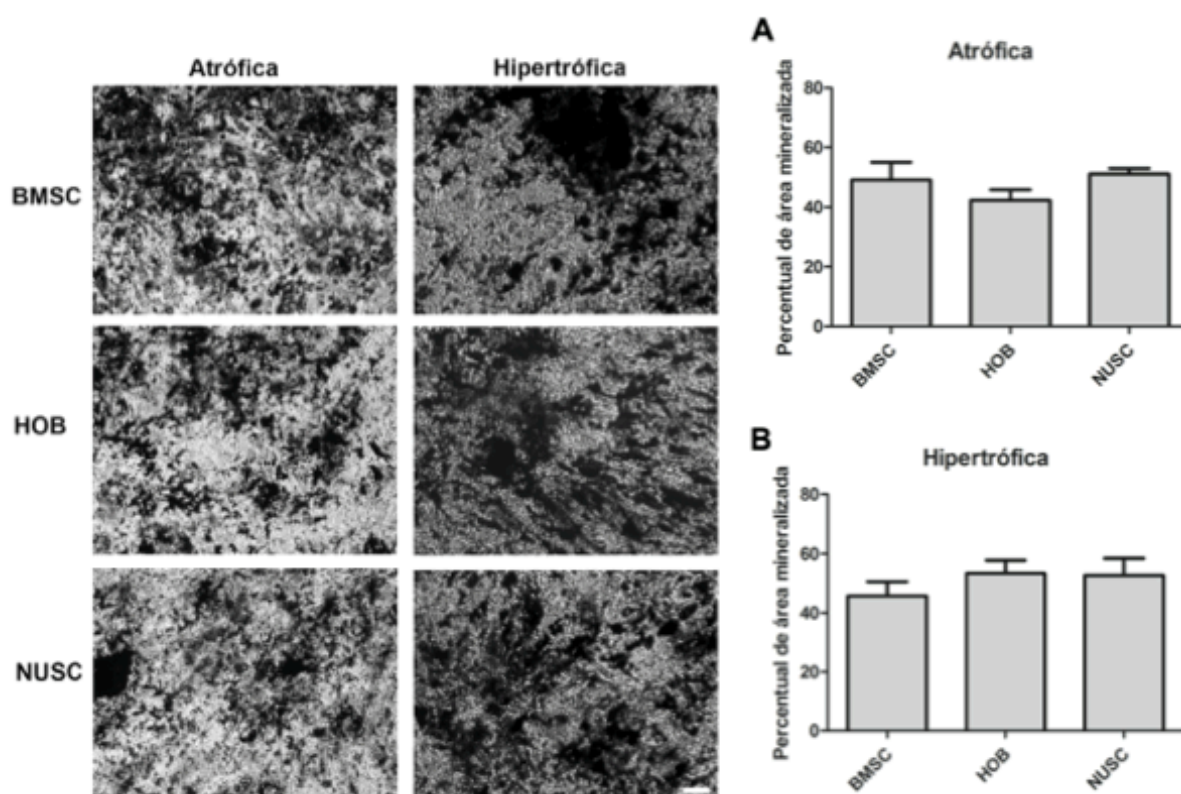


Figura 11. Avaliação do potencial *in vitro* de diferenciação osteogênica das células isoladas do foco de pseudoartrose. Diferenciação osteogênica *in vitro*. BMSC, HOB e NUSC isoladas de pseudoartrose atrófica e hipertrófica foram tratadas com coquetel osteogênico por 21 dias e coradas pelo método de Von Kossa. Depósitos de matriz mineralizada são evidenciados em preto. Barra de escala = 100µm. Quantificação de área mineralizada revelada pela coloração de Von Kossa. Dados representam média $\pm$ DP de experimentos independentes com triplicatas. (A) Grupo Atrófica: BMSC, n = 4; HOB, n = 4; NUSC, n = 4. (B) Grupo Hipertrófica: BMSC, n = 4; HOB, n = 4; NUSC, n = 2.

4.6 Avaliação do potencial osteogênico *in vivo* de NUSC atrófica

Para confirmar a capacidade das NUSC atróficas de formar osso *in vivo*, as células foram transplantadas em associação com hidroxiapatita/tricálcio fosfato (HA/TCP) no subcutâneo de camundongos imunodeficientes. Doze semanas após o implante de HA/TCP celularizado com células NUSC no dorso dos camundongos imunodeficientes, verificou-se formação heterotópica de osso em relação com os cristais de HA/TCP (Fig. 12). A presença de células hematopoiéticas no interior da neoformação tecidual é uma confirmação indireta da reconstrução do estroma medular. Esses achados demonstram que as células NUSC, além do potencial mais restrito de formar osso foram capazes de reconstituir o microambiente medular, confirmando a presença na população de NUSC de células multipotentes com potencial menos restrito.

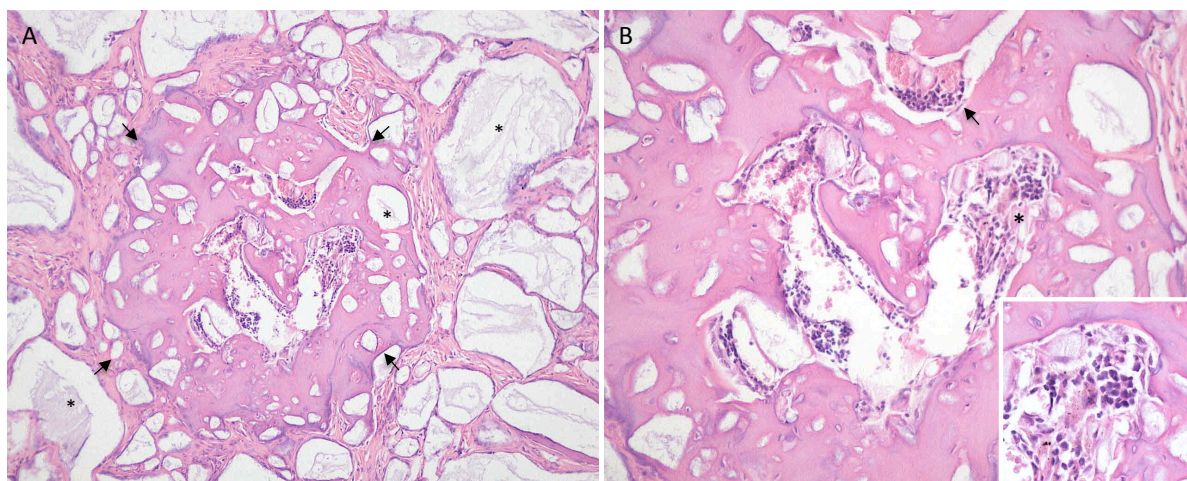


Figura 12. Potencial de formação óssea *in vivo* das células isoladas do foco de pseudoartrose. (A) Implante de HA/TCP celularizado com células NUSC exibindo neoformação óssea heterotópica (delimitada externamente pelas setas), constituída pela deposição de osso sobre a superfície de resíduos de HA/TCP (*). (B) No centro da neoformação óssea observa-se esboço de cavitação contendo células hematopoiéticas relacionadas espacialmente com vasos sanguíneos neoformados (seta). No detalhe (*) a presença das células hematopoiéticas confirma que houve formação de estroma medular e, consequentemente, recomposição do microambiente da medula óssea. Cortes histológicos com quatro micra de espessura corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina. (A) 10X; (B) 20X e Detalhe 40X.

5. DISCUSSÃO

A pseudoartrose de ossos longos é cada vez mais prevalente nos grandes centros urbanos. Esse fato decorre, dentre outros fatores, do aumento da energia cinética nos traumas sofridos em acidentes de trânsito (BROWNER *et al.*, 2008). É uma condição de saúde com consequências graves tanto sobre os pacientes como para a sociedade. Os pacientes com pseudoartrose frequentemente são submetidos a diversos procedimentos cirúrgicos, com aumento progressivo da morbidade potencial, e as sequelas, tanto do ponto de vista físico quanto psíquico não são raras, e muitos apresentam incapacidade funcional residual (BROWNER *et al.*, 2008). Por conseguinte, sendo uma doença prevalente na população em idade economicamente ativa, causa um impacto social importante ao diminuir a capacidade da força de trabalho e, assim, influenciar negativa e diretamente na economia. O custo do tratamento destes pacientes e de sua reabilitação, associados ao fato de muitos não retornarem às suas funções laborativas de forma completa e ao estado funcional pré lesão, aumentam a importância do estudo desta afecção particularmente para a definição de melhores estratégias terapêuticas.

Os resultados do presente estudo demonstram que as células isoladas do tecido do foco de pseudoartrose diafisária de ossos longos (NUSC) apresentam características imunofenotípicas de células da linhagem osteogênica, com padrão de diferenciação *in vitro* semelhante ao das células do estroma da medula óssea (BMSCs). Além disso, verificou-se que as NUSC são capazes de formar osso quando transplantadas *in vivo*, recriando um microambiente hematopoiético heterotópico.

Desde a descoberta de que os tecidos do foco de pseudoartrose atrófica não são avasculares (REED *et al.*, 2002), foi fortalecida a hipótese da pseudoartrose ser decorrente da redução do número de osteoprogenitores na medula óssea (SEEBACH *et al.*, 2007; MATHIEU *et al.*, 2013). Através da análise de CFE, que reflete uma estimativa aproximada da frequência de células osteoprogenitoras a cada 100.000 células nucleadas da medula (KUSNETZOV *et al.*, 2009), verificamos que a maioria dos pacientes com pseudoartrose atrófica apresentaram uma menor frequência de osteoprogenitores, em comparação com os portadores de pseudoartrose hipertrófica. Apenas dois pacientes do grupo com a forma atrófica contrariaram esta tendência, apresentando frequências maiores que a média dos demais pacientes do grupo (doadores 1-6) e do grupo com a forma hipertrófica.

Uma possível explicação para estes achados poderia estar relacionada com a idade desses pacientes. Em estudo realizado por Kusnetzov e colaboradores (2009) verificou-se que a frequência de osteoprogenitores na medula óssea está inversamente relacionada com a idade. Dois doadores da forma atrófica tinham 25 e 34 anos, respectivamente, enquanto a média de idade dos demais pacientes do grupo foi de $50,8 \pm 11,2$ anos e do grupo da forma hipertrófica, $44,25 \pm 16,7$ anos. No entanto, não podemos descartar a provável influência de fatores intrínsecos desconhecidos relacionados com a variabilidade interpessoal.

Devemos ressaltar, porém, que com exceção do doador 8, todos os demais pacientes avaliados, de ambos os grupos, apresentaram frequências inferiores aos valores médios descritos para indivíduos hígidos, que é de $32,3 \pm 3,0$ células a cada dez mil células nucleadas (Kuznetsov *et al.*, 2009). Apesar do número de pacientes avaliados ter sido pequeno, nossos resultados, associados aos trabalhos de Seebach *et al.* (2007) e Mathieu *et al.* (2013), são um importante indicativo de uma possível deficiência intrínseca na capacidade de formação óssea nos pacientes que

evoluem para pseudoartrose. Além disso, se considerarmos o conceito clássico de que a pseudoartrose atrófica tem o componente biológico como fator mais influente para sua ocorrência (WEBER e CECH, 1976), a menor frequência de osteoprogenitores nestes pacientes, em relação aos da forma hipertrófica, pode sugerir que essa deficiência seja ainda mais significativa nesses indivíduos. Análises adicionais, com um maior número de pacientes devem ser realizadas afim de confirmar estas hipóteses.

Por outro lado, observamos que o potencial clonogênico das BMSCs de ambos os grupos foi equivalente, o que denota uma capacidade proliferativa comparável, independente do tipo de pseudoartrose. Assim, pode-se supor que mesmo em menor frequência, as células osteoprogenitoras possam ser estimuladas a proliferar por sinalizações mediadas no local da fratura, uma vez que estas estejam ocorrendo em condições ótimas, compensando o prejuízo numérico. No entanto, não há evidências concretas na literatura vigente sobre como as sinalizações celulares responsáveis pela indução de migração e proliferação de osteoprogenitores ocorrem após uma fratura, dentro de um contexto dose-temporal, assim como se estas ocorrem de forma eficiente nos casos que resultam em pseudoartrose.

Os trabalhos de Bajada e colaboradores (2009) e Iwakura e colaboradores (2009) foram significativos ao demonstrarem que o tecido do foco de pseudoartrose, anteriormente considerado apenas um tecido fibroso, continha células com características imunofenotípicas semelhantes às BMSC. No presente estudo verificamos que, além dos marcadores clássicos requeridos para inclusão de determinada população como pertencente ao sistema estromal da medula óssea, isto é, CD90, CD73 e CD105 (DOMINICI, 2006), uma fração das NUSC, de ambos tipos de pseudoartrose, também expressa o antígeno CD146. Conforme

demonstrado por estudos da área, uma em cada cinco células CD146⁺ são multipotentes e é, nesta fração, que residem as células com capacidade comprovada de autorrenovação (SACCHETTI *et al.*, 2007), característica específica das células-tronco (neste caso, as SSCs). Assim, concluímos que as NUSC são de fato originárias do sistema estromal da medula óssea e que estas populações ainda contém uma fração com significativo potencial osteogênico e capacidade de manutenção do 'turnover' ósseo.

No entanto, em termos proporcionais, a composição das populações de NUSC se assemelhou mais à das células isoladas a partir de osso cortical (HOB), ambas com um percentual de células CD146⁺ significativamente menor que o observado nas culturas de BMSCs. Como osteoblastos maduros não expressam CD146 (SACCHETTI *et al.*, 2007), uma maior proporção de células com expressão negativa deste antígeno pode indicar um enriquecimento em células em estágio mais tardio de comprometimento na progressão da diferenciação. Dessa forma, é possível supor que as NUSC sejam originárias de BMSCs que migraram para o foco fraturário e iniciaram a diferenciação, mas que por algum motivo interromperam esse processo, culminando na falha da consolidação. A permanência de um pequeno conjunto de células CD146⁺ neste tecido não contraria essa hipótese, uma vez que estas células, além de gerarem progênie mais diferenciadas, também se autorrenovam, perpetuando seu conjunto no tecido neoformado (SACCHETTI *et al.*, 2007).

Considerando que as NUSC são originárias de um tecido resultante de um processo regenerativo mal sucedido, investigamos se sua capacidade proliferativa teria sido comprometida, levando-as a um estado de senescência. Verificamos que as NUSC apresentaram um tempo de duplicação populacional tendencialmente superior ao observado nas culturas de BMSCs, mas não estatisticamente

significativo. No entanto, o percentual de células em estado de senescência ao fim do período de expansão, no qual todas as culturas haviam realizado um número similar de duplicações populacionais, foi equiparável entre ambas, sugerindo que a capacidade proliferativa das NUSC não foi significativamente prejudicada pelos eventos experimentados *in vivo*. Estas observações vão de encontro aos resultados de Bajada e colaboradores (2009), que reportaram um aumento no número de células senescentes nas culturas de NUSC isoladas de pseudoartrose atrófica de forma diretamente proporcional à quantidade de duplicações populacionais *in vitro*, em comparação com culturas de BMSCs isoladas de pacientes hígidos. Contudo, deve-se salientar que a avaliação de senescência sob cultivo *in vitro* é altamente influenciada pelas condições de cultivo. Além disso, nossas análises foram realizadas com todos os tipos celulares isolados de pacientes com pseudoartrose, enquanto Bajada e colaboradores (2009) usaram BMSCs de pacientes hígidos como parâmetro. Considerando dados que associam alterações genéticas, como polimorfismos, à propensão à pseudoartrose, sendo alguns deles em genes relacionados a controle de proliferação, como FGFR1, não é possível descartar a hipótese de as células de pacientes com pseudoartrose apresentarem padrões de proliferação/senescência distintos das células isoladas de pacientes hígidos. Portanto, uma vez que nossas análises foram realizadas somente com células de pacientes com pseudoartrose, concluímos que nossas análises são válidas e que comparativamente às BMSCs desses pacientes, as NUSC não constituem uma população enriquecida em células senescentes.

Seguindo o objetivo principal deste estudo, avaliamos inicialmente a capacidade de diferenciação das NUSC em sistema *in vitro*, uma vez que são análises requeridas para classificação de um tipo celular como pertencente ao sistema estromal da medula óssea (DOMINICI *et al.*, 2006). Verificamos que assim

como as BMSCs e HOB, as NUSC de ambos tipos de pseudoartrose foram capazes de gerar adipócitos e depositar matriz mineralizada, reforçando a hipótese de sua origem estromal.

No entanto, como descrito por Bonewald e colaboradores (2003) e Diascro e colaboradores (1998), o sistema *in vitro* de indução osteogênica e adipogênica apresenta alta taxa de resultados falso-positivos. O primeiro autor mostrou que calcificações distróficas não podem ser diferenciadas da mineralização da matriz extracelular por meio de colorações histoquímicas. Já Diascro e colaboradores demonstraram que o acúmulo citoplasmático de gordura pode ser originado a partir de absorção lipídica do soro e não de síntese celular própria. Por conseguinte, optamos por avaliar a diferenciação celular *in vivo*, visto ser o método de análise que permite que as células expressem sua real capacidade de diferenciação, sem as sinalizações artificiais do sistema de cultura *in vitro* (ROBEY *et al.*, 2014).

A análise histológica dos implantes de NUSC atroficas demonstrou que estas células foram capazes de formar tecido ósseo *in vivo*, além de gerar áreas de estroma mielosuportivo, o que somente é observado em culturas que contém uma subpopulação de células verdadeiramente multipotentes (SACHETTI *et al.*, 2007; SWORDER *et al.*, 2015). A tradução destes resultados no ambiente clínico leva ao entendimento de que as NUSC de pseudoartroses atroficas são capazes de gerar osso *in vivo*, uma vez que as condições do microambiente sejam propícias, o que contraria em parte a teoria de Weber e Cech (1976).

Amplamente definida no meio ortopédico como resultante de uma falha biológica, a pseudoartrose atrofica tem seu tratamento condicionado, entre outros, à enxertia óssea autóloga, para realizar aporte de células com maior potencial de diferenciação ao foco. Embora não possamos excluir totalmente que esta afecção não resulta realmente de um problema biológico intrínseco, nossos resultados

indicam que os osteoprogenitores não são a causa principal da falha na consolidação, mas que talvez o ambiente, não apresente as sinalizações adequadas para induzir e possibilitar sua diferenciação.

Embora nosso estudo tenha tido algumas limitações, como o baixo número de amostras e a não avaliação do potencial de diferenciação *in vivo* das NUSC hipertróficas, confirmamos que as células presentes no tecido do foco fraturário são de fato originárias do sistema estromal e que, portanto, são osteoprogenitores. Além disso, demonstramos que as NUSC atróficas detêm potencial para formar osso *in vivo*, não sendo a principal causa da falha na consolidação.

Em suma, estas análises permitiram acrescentar ao estudo da etiopatogenia da pseudoartrose um dado de importância ímpar, ao evidenciar a presença de células eficientes no foco de pseudoartrose atrófica, anteriormente tido como ambiente biologicamente inerte. Isto reforça a idéia de que o tratamento cirúrgico de pseudoartrose realizado atualmente, possa ser conduzido de forma mais abrangente, conforme sugerido por Calori e Giannoudis (2011) ao descreverem o conceito diamante no entendimento da consolidação óssea.

Estes autores definiram o foco fraturário como uma câmara biológica, onde quatro fatores seriam primordiais para a consolidação: a estabilidade mecânica, o suporte osteocondutor, os fatores de crescimento osteoindutores e as BMSCs (GIANNOUDIS, 2011b; GIANNOUDIS *et al.*, 2013). Portanto, o tratamento da pseudoartrose deveria ser uma combinação destes fatores, ou seja, uma politerapia, provendo ao foco fraturário todos os elementos tidos como essenciais à consolidação (CALORI e GIANNOUDIS, 2011). Por conseguinte, a proposta terapêutica evoluiu em relação ao considerado padrão ouro anteriormente, que seria somente a enxertia autóloga, associada à revisão da osteossíntese quando julgado necessário. Assim, diante dos resultados deste estudo, entendemos que a

politerapia no âmbito do conceito diamante poderia ter o fator celular minimizado, ressaltando o papel dos fatores osteoindutores, já que uma vez que recebam as sinalizações apropriadas, as células residentes no foco fraturário seriam capazes de diferenciar e formar osso.

Alguns autores avaliaram tratamentos de pseudoartroses com esta mesma diretriz, como Kanakaris e colaboradores (2009), em estudo multicêntrico que evidenciou consolidação de 26 em 30 pseudoartroses femorais com o uso de BMP7, sem efeitos adversos. De forma análoga, este mesmo autor mostrou em pseudoartroses de tíbia tratadas com BMP7, ao longo de três anos, 89,7% de consolidação, sem efeitos adversos importantes (KANAKARIS *et al.*, 2008). No entanto, o aporte biológico esperado das BMPs foi mais recentemente comparado ao uso de enxerto ósseo autólogo, por Blokhuis e colaboradores (2013), em revisão sistemática, mostrando que as taxas de consolidação dos dois métodos são comparáveis, e que o uso indiscriminado das BMPs apresenta efeitos adversos importantes. Assim, apesar da alta expectativa criada em torno desta solução biológica, que diminuiria os problemas relacionados à morbidade da enxertia autóloga no sítio doador e à qualidade desta nos pacientes idosos, ainda há necessidade de definição de indicações ideais para seu uso.

Por fim, acreditamos que a futura direção do desenvolvimento de estratégias para tratamento da pseudoartrose deve ressaltar a influência do microambiente e das sinalizações celulares, com o objetivo de determinar os fatores osteoindutores. Estes, uma vez aplicados ao foco fraturário, poderiam induzir a diferenciação dos osteoprogenitores locais, aumentando as taxas de consolidação (VALLIM *et al.*, 2016)

6. CONCLUSÕES

1. Não houve diferenças em relação ao potencial clonogênico dos progenitores mesenquimais entre os dois tipos de pseudoartrose. No entanto, houve menor número médio de CFU-F nos pacientes com pseudoartrose atrófica;
2. As características morfológicas e imunofenotípicas das NUSC confirmam a sua origem do compartimento estromal da medula óssea, com características mais similares aos HOB do que às BMSCs;
3. As NUSC apresentam ciclos de proliferação tendencialmente mais lentos, quando comparados a HOB e BMSC, sem relação com a entrada em estado de senescência;
4. As NUSC apresentam potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro* comparável às BMSC e HOB;
5. As NUSC, quando transplantadas *in vivo*, apresentam capacidade de formação óssea, e também de recriar um microambiente hematopoiético heterotópico, confirmando a presença de células multipotentes nestas populações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPENBERG. Annotation: parathyroid hormone and fracture healing. *Acta Orthop* 84(1): 4-6. 2013.

BAJADA S, MARSHALL MJ, WRIGHT KT, RICHARDSON JB, JOHNSON WE. Decreased osteogenesis, increased cell senescence and elevated Dickkopf-1 secretion in human fracture non union stromal cells. *Bone* 45(4): 726-735. 2009

BETTS D, MÜLLER R. Mechanical regulation of bone regeneration: theories, models, and experiments. *Front Endocrinol* 5: 211(1-14). 2014.

BIANCO P, COSSU G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res* 251(2): 257-263. 1999.

BIANCO P, ROBEY PG, SIMMONS PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2(4): 313-319. 2008.

BIANCO P, ROBEY PG, SAGGIO I, RIMINUCCI M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther* 21(9): 1057-1066. 2010

BIANCO P. Back to the future: moving beyond "mesenchymal stem cells". *J Cell Biochem* 112(7): 1713-1721. 2011.

BIANCO P, CAO X, FRENETTE PS, MAO JJ, ROBEY PG, SIMMONS PJ, WANG CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 19(1): 35-42. 2013.

BLOKHUIS TJ, CALORI GM, SCHMIDMAIER G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence? *Injury* 44(S1): S40-S42. 2013.

BONEWALD LF, HARRIS SE, ROSSER J, DALLAS MR, DALLAS SL, CAMACHO NP, BOYAN B, BOSKEY A. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization *in vitro* represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72(5): 537-47. 2003.

BORRELLI J, PAPE C, HAK D, HSU J, LIN S, GIANNOUDIS P, LANE J. Physiological challenges of bone repair. *J Orthop Trauma* 26(12): 708-711. 2012.

BROWNER BD, LEVINE AM, JUPITER JB, TRAFTON PG, KRETTEK C. Skeletal Trauma: Expert consult. W. B. Saunders, Philadelphia, 2008.

BROWNLOW HC, REED A, HAMISH A, SIMPSON RW. The vascularity of atrophic nonunions. *Injury* 33: 145-150. 2002.

BUCKWALTER JA, COOPER RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect* 36: 27-48. 1987.

BUCKWALTER JA, GLIMCHER MJ, COOPER RR, RECKER R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45: 371-386. 1996.

CALORI GM, ALBISETTI W, AGUS A, IORI S, TAGLIABUE L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury* 38 Suppl 2:S11-18. 2007.

CALORI GM, PHILLIPS M, JEETLE S, TAGLIABUE L, GIANNOUDIS PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury* 39 Suppl 2: S59-63. 2008.

CALORI GM, GIANNOUDIS PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury* 42(11): 1191-1193. 2011.

CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5): 641-650. 1991.

CHAN CK, LINDAU P, JIANG W, CHEN JY, ZHANG LF, CHEN CC, SEITA J, SAHOO D, KIM JB, LEE A, PARK S, NAG D, GONG Y, KULKARNI S, LUPPEN CA, THEOLOGIS AA, WAN DC, DEBOER A, SEO EY, VINCENT-TOMPKINS JD, LOH K, WALMSLEY GG, KRAFT DL, WU JC, LONGAKER MT, WEISSMAN IL. Clonal precursor of bone, cartilage, and hematopoietic niche stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(31): 12643-12648. 2013

CHAN JK, GLASS GE, ERSEK A, FREIDIN A, WILLIAMS GA, GOWERS K, ESPIRITO SANTO AI, JEFFERY R, OTTO WR, POULSOM R, FELDMANN M, RANKIN SM, HORWOOD NJ, NANCHAHAL J. Low-dose TNF augments fracture healing in normal and osteoporotic bone by up-regulating the innate immune response. *EMBO Mol Med* 7(5): 547-561. 2015.

CHO TJ, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17(3): 513-520. 2002

CLIFTON KB, PAGLIA DN, SOUNG DO Y, WOLF JM, MOSS IL, DRISSI H. Effects of Wnt5a haploinsufficiency on bone repair. *J Orthop Trauma* 28(8): e191-197. 2014.

COLVIN JS, BOHNE BA, HARDING GW, MCEWEN DG, ORNITZ DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12(4): 390-397. 1996.

DA SILVA MEIRELLES L, CAPLAN AI, NARDI NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(9): 2287-2299. 2008.

DENG C, WYNshaw-BORIS A, ZHOU F, KUO A, LEDER P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84(6): 911-921. 1996.

DIASCRO DD JR, VOGEL RL, JOHNSON TE, WITHERUP KM, PITZENBERGER SM, RUTLEDGE SJ, PRESCOTT DJ, RODAN GA, SCHMIDT A. High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res* 13(1): 96-106. 1998.

DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D, GIANNOUDIS PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 9: 66. 2011.

- DIMITRIOU R, GIANNOUDIS PV. The genetic profile of bone repair. *Clin Cases Miner Bone Metab* 10(1): 19-21. 2013a.
- DIMITRIOU R, KANAKARIS N, SOUCACOS PN, GIANNOUDIS PV. Genetic predisposition to non-union: evidence today. *Injury* 44: S50-S53. 2013b.
- DING L, SAUNDERS TL, ENIKOLOPOV G, MORRISON SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481(7382): 457-462. 2012.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP D, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317. 2006.
- DRISSI H, PALIA DN, ALAEE F, YOSHIDA R. Constructing the toolbox: Patient-specific genetic factors of altered fracture healing. *Genes Dis* 1(2): 140-148. 2014.
- EBRAHEIM NA, SAVOLAINE ER, PATEL A, SKIE M, JACKSON WT. Assessment of tibial fracture union by 35-45 degrees internal oblique radiographs. *J Orthop Trauma* 5(3): 349-350. 1991.
- EINHORN TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19 (10 Suppl): S4-6. 2005.
- EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11(1): 45-54. 2015.
- FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA UF, KULAGINA NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4(5): 267-274. 1976.
- FROLKE JP, PATKA P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 38 Suppl 2: S19-22. 2007.
- GANGJI V. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 53(2): 391-398. 2013.
- GERSTENFELD LC, CULLINANE DM, BARNES GL, GRAVES DT, EINHORN TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88(5): 873-884. 2003.
- GIANNOUDIS PV, JONES E, EINHORN TA. Fracture healing and bone repair. *Injury* 42(6): 549-50. 2011a.
- GIANNOUDIS PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber. *Injury* 42: 1191-93. 2011b.
- GIANNOUDIS PV, AHMAD MA, MINEO GV, TOSOUNIDIS TI, CALORI GM, KANAKARIS NK. Subtrochanteric fracture non-unions with implant failure managed with the "Diamond" concept. *Injury* 44(S1): S76-S81. 2013.

GIANNOTTI S, BOTTAI V, DELL'OSSO G, PINI E, DE PAOLA G, BUGELLI G, GUIDO G. Current medical treatment strategies concerning fracture healing. *Clin Cases Miner Bone Metab* 10(2): 116-120. 2013.

GLASS GE, CHAN JK, FREIDIN A, FELDMANN M, HORWOOD NJ, NANCHAHAL J. TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Prot Natl Acad Sci USA* 108(4): 1585-90. 2011.

GÓMEZ-BARRENA E, ROSSET P, LOZANO D, STANOVICI J, ERMTHALLER C, GERBHARD F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 70: 93-101. 2015.

GUIMARÃES JAM, GUIMARÃES IC, DUARTE MEL, VIEIRA T, VIANNA VF, FERNANDES MB, VIEIRA AR, CASADO PL. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 genes are associated with fracture non-union. *J Orthop Res* 31(12):1971-1979. 2013.

HADJIARGYROU M, O'KEEFE RJ. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. *J Bone Miner Res* 29(11): 2307-2322. 2014.

HERNIGOU P, BEAUJEAN F. Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by *in vitro* cloning. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 83(1): 33-40. 1997.

HOBBY B, LEE MA. Managing atrophic nonunion in the geriatric population: incidence, distribution, and causes. *Orthop Clin North Am* 44(2): 251-256. 2013.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5): 393-395. 2005.

IWAKURA T, MIWA M, SAKAI Y, NIIKURA T, LEE SY, OE K, HASEGAWA T, KURODA R, FUJIOKA H, DOITA M, KUROSAKA M. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity *in vitro*. *J Orthop Res* 27(2): 208-215. 2009.

KABACK LA, SOUNG DO Y, NAIK A, GENEAU G, SCHWARZ EM, ROSIER RN, O'KEEFE RJ, DRISSI H. Teriparatide (1-34 human PTH) regulation of osterix during fracture repair. *J Cell Biochem* 105(1): 219-226. 2008.

KANAKARIS NK, CALORI GM, VERDONK R, BURSSSENS P, DE BIASE P, CAPANNA R, VANGOSA LB, CHERUBINO P, BALDO F, RISTINIEMI J, KONTAKIS G, GIANNOUDIS PV. Application of BMP-7 to tibial nonunions: a 3-year multicenter experience. *Injury* 39(S2): S83-S90. 2008.

KANAKARIS NK, LASANIANOS N, CALORI GM, VERDONK R, BLOKHUIS TJ, CHERUBINO P, DE BIASE P, GIANNOUDIS PV. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience. *Injury* 40(S3): S54-S61. 2009.

KOMATSU DE, MARY MN, SCHROEDER RJ, ROBLING AG, TURNER CH, WARDEN SJ. Modulation of Wnt signaling influences fracture repair. *J Orthop Res* 28(7): 928-936. 2010.

KON T, CHO TJ, AIZAWA T, YAMAZAKI M, NOOH N, GRAVES D, GERSTENFELD LC, EINHORN TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16(6): 1004-1014. 2001.

KOOISTRA BW, DIJKMAN BG, BUSSE JW, SPRAGUE S, SCHEMITSCH EH, BHANDARI M. The radiographic union scale in tibial fractures: reliability and validity. *J Orthop Trauma* 24 Suppl 1: S81-86. 2010.

KOSAKI N, TAKAISHI H, KAMEKURA S, KIMURA T, OKADA Y, MINQI L, AMIZUKA N, CHUNG UI, NAKAMURA K, KAWAGUCHI H, TOYAMA Y, D'ARMIENTO J. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 354(4): 846-851. 2007.

KUZNETSOV SA, MANKANI MH, BIANCO P, ROBEY PG. Enumeration of the colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Res* 2(1): 83-94. 2009.

KWONG FNK, HARRIS MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg* 16: 619-625. 2008.

KWONG FNK, HOYLAND J, FREEMONT A, EVANS C. Altered Relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res*, 27: 752-757. 2009

LIEBERGALL M, SCHROEDER J, MOSHEIFF R, GAZIT Z, YORAM Z, RASOOLY L, DASKAL A, KHOURY A, WEIL Y, BEYTH S. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: A randomized and prospective preliminary study. *Mol Ther* 21(8): 1631-1638. 2013.

LONGO UG, TROVATO U, LOPPINI M, RIZZELLO G, KHAN WS, MAFFULLI N, DENARO V. Tissue engineered strategies for pseudarthrosis. *Open Orthop J* 6 (Suppl 3:M12): 564-570. 2012.

MANKANI MH, KUZNETSOV SA, ROBEY PG. Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density. *Exp Hematol* 35(6): 995-1004. 2007.

MARSELL R, EINHORN TA. The biology of fracture healing. *Injury* 42(6): 551-555. 2011.

MATHIEU M, RIGUTTO S, INGELS A, SPRUYT D, STRICWANT N, KHARROUBI I, ALBARANI V, JAYANKURA M, RASSCHAERT J, BASTIANELLI E, GANGJI V. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. *Bone* 53(2): 391-398. 2013.

MCCARTHY MI, ABECASIS GR, CARDON LR, GOLDSTEIN DB, LITTLE J, IOANNIDIS JP, HIRSCHHORN JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9(5): 356-369. 2008.

MCKIBBIN B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B(2): 150-162. 1978.

MEGAS P. Classification of non-union. *Injury* 36 Suppl 4: S30-37. 2005.

MENDEZ-FERRER S, MICHURINA TV, FERRARO F, MAZLOOM AR, MACARTHUR BD, LIRA SA, SCADDEN DT, MA'AYAN A, ENIKOLOPOV GN, FRENETTE PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466(7308): 829-834. 2010.

METSEMAKERS WJ, ROELS N, BELMANS A, REYNDERS P, NIJS S. Risk factors for nonunion after intramedullary nailing of femoral shaft fractures: Remaining controversies. *Injury* 46: 1601-1607. 2015.

MORRISON SJ, SCADDEN DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505(7483): 327-334. 2014.

NAKAMURA Y. DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J Hum Genet* 54(1): 1-8. 2009.

ORYAN A, MONAZZAH S, BIGHAM-SADEGH A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci* 28(1): 57-71. 2015.

PERREN SM. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br* 84(8): 1093-1110. 2002.

PERREN SM. Fracture healing: Fracture healing understood as the result of a fascinating cascade of physical and biological interactions. Part II. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 82(1): 13-21. 2015.

PITERS E, BOUDIN E, VAN HUL W. Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 112-116. 2008.

PITTENGER MF. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147. 1999.

QUACCI D, DELL'ORBO C, SALVI M, BARTOLOZZI P, MISASI M. Ultrastructural aspects of human nonunion. *Histol Histopathol* 6(1): 87-93. 1991.

REED AA, JOYNER CJ, BROWNLOW HC, SIMPSON AH. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J Orthop Res* 20(3): 593-599. 2002.

ROBEY PG, KUZNETSOV SA, RIMINUCCI M, BIANCO P. Bone marrow stromal cell assays: in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol* 1130: 279-293. 2014.

SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, DI CESARE S, PIERSANTI S, SAGGIO I, TAGLIAFICO E, FERRARI S, ROBEY PG, RIMINUCCI M, BIANCO P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131(2): 324-336. 2007.

SANTAVIRTA S, KONTTINEN YT, NORDSTROM D, MAKELA A, SORSA T, HUKKANEN M, ROKKANEN P. Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand* 63(6): 579-586. 1992.

SATHYENDRA V, DONAHUE HJ, VRANA KE, BERG A, FRYZEL D, GANDHI J, REID JS. Single nucleotide polymorphisms in osteogenic genes in atrophic delayed fracture-healing: a preliminary investigation. *J Bone Joint Surg Am* 96(15): 1242-1248. 2014.

SCHMIDT-BLEEK K, KWEE BJ, MOONEY DJ, DUDA GN. Boon and Bane of inflammation in bone tissue regeneration and its link with angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev*, 21(4): 354-64. 2015.

SCHWABE P, SIMON P, KRONBACH Z, SCHMIDMAIER G, WILDEMAN B. A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue. *Int Orthop* 38 (12): 2623-2629. 2014.

SEEBACH C, HENRICH D, TEWKSBURY R, WILHELM K, MARZI I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 80(4): 294-300. 2007.

SHAPIRO F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 70(7): 1067-1081. 1988.

SHIMOAKA T, KAMEKURA S, CHIKUDA H, HOSHI K, CHUNG UI, AKUNE T, MARUYAMA Z, KOMORI T, MATSUMOTO M, OGAWA W, TERAUCHI Y, KADOWAKI T, NAKAMURA K, KAWAGUCHI H. Impairment of bone healing by insulin receptor substrate-1 deficiency. *J Biol Chem* 279(15): 15314-15322. 2004.

SOEHNLEIN O, LINDBOM L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10(6): 427-439. 2010.

SU N, YANG J, XIE Y, DU X, LU X, YIN Z, YIN L, QI H, ZHAO L, FENG J, CHEN L. Gain-of-function mutation of FGFR3 results in impaired fracture healing due to inhibition of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 376(3): 454-459. 2008.

SWORDER BJ, YOSHIKAWA S, MISHRA PJ, CHERMAN N, KUZNETSOV SA, MERLINO G, BALAKUMARAN A, ROBEY PG. Molecular profile of clonal strains of human skeletal stem/progenitor cells with different potencies. *Stem Cell Res* 14(3): 297-306. 2015.

TSUJI K, BANDYOPADHYAY A, HARFE BD, COX K, KAKAR S, GERSTENFELD L, EINHORN T, TABIN CJ, ROSEN V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38(12): 1424-1429. 2006.

URIST MR, MAZET RJ, MCLEAN FC. The pathogenesis and treatment of delayed union and nonunion. *J Bone Joint Surg Am* 36 (5): 931-980. 1954.

VALLIM FCM, CAVALCANTI AS, DIAS RB, SARTORE RC, LEAL AC, DUARTE MEL, GUIMARÃES JM, BONFIM DC. Atrophic nonunion tissue contains stromal cells with potential to perform ossification *in vitro* and *in vivo*. ORS Annual Meeting, Orlando, FL, March 5-8, 2016.

WALSH MC, KIM N, KADONO Y, RHO J, LEE SY, LORENZO J, CHOI Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24: 33-63. 2006.

WANG YH, QIU Y, HAN XD, XIONG J, CHEN YX, SHI HF, KARAPLIS A. Haploinsufficiency of endogenous parathyroid hormone-related peptide impairs bone fracture healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40(11): 715-723. 2013.

WEBER BG, CECCH O. Pseudarthrosis: pathophysiology, biomechanics, therapy, results. New York, Grune & Stratton, 1976.

WORTHLEY DL, CHURCHILL M, COMPTON JT, TAILOR Y, RAO M, SI Y, LEVIN D, SCHWARTZ MG, UYGUR A, HAYAKAWA Y, GROSS S, RENZ BW, SETLIK W, MARTINEZ AN, CHEN X, NIZAMI S, LEE HG, KANG HP, CALDWELL JM, ASFAHA S, WESTPHALEN CB, GRAHAM T, JIN G, NAGAR K, WANG H, KHEIRBEK MA, KOLHE A, CARPENTER J, GLAIRE M, NAIR A, RENDERS S, MANIERI N, MUTHUPALANI S, FOX JG, REICHERT M, GIRAUD AS, SCHWABE RF, PRADERE JP, WALTON K, PRAKASH A, GUMUCIO D, RUSTGI AK, STAPPENBECK TS, FRIEDMAN RA, GERSHON MD, SIMS P, GRIKSCHAIT T, LEE FY, KARSENTY G, MUKHERJEE S, WANG TC. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell* 160(1-2): 269-284. 2015.

ZECKEY C, HILDEBRAND F, GLAUBITZ LM, JURGENS S, LUDWIG T, ANDRUSZKOW H, HUFNER T, KRETTEK C, STUHRMANN M. Are polymorphisms of molecules involved in bone healing correlated to aseptic femoral and tibial shaft non-unions? *J Orthop Res* 29(11): 1724-1731. 2011.

ZHOU BO, YUE R, MURPHY MM, PEYER JG, MORRISON SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15(2): 154-168. 2014.

8. APÊNDICES E/OU ANEXOS

Anexo 1. Escore RUST para avaliação de consolidação radiográfica

As pontuações corticais individuais são somadas (anterior, posterior, medial, e lateral) para obter um valor RUST radiográfico, que varia desde 4 (consolidação inexistente) até 12 (consolidação completa).

Critério Radiográfico		
Pontuação por cortical	Calo	Traço de fratura
1	Ausente	Visível
2	Presente	Visível
3	Presente	Invisível

Anexo 2. Ficha de identificação e cadastro dos pacientes

Data: ____/____/____

Nº prontuário: _____

Pesquisa: **Avaliação das características morfofuncionais e do potencial osteogênico de células estromais do foco fraturário de pseudoartrose atrófica e hipertrófica**

Projeto CAAE n 23348613.0.0000.5273 aprovado CEP/INTO em 02/12/2013

Ficha clínica

Iniciais:	Nasc:	Sexo	Etnia	Nacionalidade
------------------	--------------	-------------	--------------	----------------------

Critérios de exclusão:

☐ fraturas em decorrência de doença inflamatória/ autoimune

☐ osteoporose

☐ doença metabólica que interfere no metabolismo cálcio/fósforo

☐ fraturas patológicas

☐ pseudoartrose hipertrófica

☐ pseudoartrose infectada

☐ gravidez

Dados relevantes para a pesquisa:

☐ tabagista

☐ uso de medicação (especificar): _____

☐ doença sistêmica: _____

☐ doença imunológica: _____

Dados relevantes da região lesionada:

☐ região acometida: _____

☐ tipo de osteossíntese: _____

☐ padrão inicial da fratura: _____

- estabilidade mecânica: ☐ presente ☐ ausente

- gap: ☐ presente ☐ ausente

- fratura: ☐ aberta ☐ fechada

☐ tipo de pseudoartrose (**escore de Calori - anexo 3**): _____

Anexo 3. Classificação de pseudoartrose segundo Calori.

O Osso		Escore	Máximo
Qualidade do Osso	Boa	0	
	Moderada (osteoporose moderada)	1	
	Ruim (severa osteoporose ou perda óssea)	2	
	Muito ruim (necrose, avascular ou séptica)	3	3
Lesão Inicial	Fratura Fechada	0	
	Exposta grau I	1	
	Exposta grau II ou III A	3	
	Exposta grau III B ou C	5	5
Cirurgias Prévias	Nenhuma	1	
	< 2	2	
	< 4	3	
	>4	4	4
Cirurgias Prévias	Minimamente invasiva	0	
(Invasividade)	Intramedular	1	
	Extramedular	2	
	Qualquer osteossíntese com enxertia óssea	3	3
Primeira Cirurgia	Estabilidade Inadequada	0	
	Estabilidade Adequada	1	1
Classificação	Hipertrófica	1	

(Weber/Cech)	Oligotrófica	3	
	Atrófica	5	5
Alinhamento Ósseo	Alinhamento não anatômico	0	
	Alinhamento anatômico	1	1
Defeito Ósseo (Gap)	0,5 - 1 cm	2	
	1 - 3 cm	3	
	> 3 cm	5	5
Partes Moles			
Status	Intacto	0	
	Cirurgia prévia, pouca cicatriz	2	
	Tratamento prévio de defeito de partes moles		
	(perda de pele, flap local, múltiplas incisões,		
	sínd. Compartimental, fístula fechada)	3	
	Tratamento complexo de defeito partes moles		
	(retalho livre microcirúrgico)	4	
	Vascularização pobre (diminuição do pulso,		
	insuficiência venosa, enchimento capilar)	5	
	Presença atual de defeito de cobertura		
	(úlceras, fístula, exposição óssea ou implante)	6	6
O Paciente		Escore	Máximo
ASA	1 ou 2	0	
	3 ou 4	1	1
Diabetes	Não	0	
	Sim, bem controlada	1	
	Sim, mal controlada	2	2

Exames de Sangue	Leucócitos > 12	1	
	VHS > 20	1	
	PCR > 20	1	3
Infecção Clínica	Assintomático	0	
	Infecção prévia ou suspeita de infecção	1	
	Séptico	4	4
Drogas	Corticóides	1	
	AINH	1	2
Tabagismo	Não	0	
	Sim	5	5

Anexo 4. Apreciação do Comitê de ética e Pesquisa do INTO

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATO - ORTOPEDIA / INTO / SAS/ MS	
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão dos genes BMP4 e FGFR1 na pseudoartrose atrófica de ossos longos

Pesquisador: Frederico Coutinho de Moura Vallim

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 23348613.0.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 476.062

Data da Relatoria: 30/10/2013

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

os objetivos estão definidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A avaliação dos riscos e benefícios estão explicitadas no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão elaborados e adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há lista de inadequações.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500		CEP: 20.940-070
Bairro: São Cristóvão		
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)2134-5000	Fax: (21)2134-5228	E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Anexo 5.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Avaliação do potencial osteogênico de células estromais do foco de pseudoartrose**. Você foi selecionado por avaliação do seu prontuário e radiografias e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Os objetivos deste estudo são: Assim como no seu caso, muitas são as fraturas que não cicatrizam apesar de serem tratadas da maneira ideal. Desconfiamos que pode haver alguma causa genética para isso, e esta pesquisa tem a intenção de avaliar se existe esta causa genética. Para isso, e sem qualquer prejuízo para o seu tratamento, iremos avaliar as células retiradas dos fragmentos de osso que devem ser removidos por não terem cicatrizado, assim como algumas células do osso que será retirado da bacia para enxerto no local da fratura (esse procedimento é padrão no tratamento desta doença), procurando alterações genéticas.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em **permitir a análise dos fragmentos ósseos retirados durante a sua cirurgia, que seriam descartados**.

Os riscos relacionados com sua participação são a persistência da não consolidação, e infecção superficial ou profunda..

Os benefícios relacionados com a sua participação são **o tratamento da pseudoartrose e o estudo da mesma para melhor entendimento e tratamento futuro**.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados da pesquisa serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação **(os seus dados serão descritos pelas suas iniciais, ou pelo número do seu prontuário, mas jamais pelo seu nome)**.

Este Termo foi redigido em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Frederico Coutinho de Moura Vallim

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil 500

Telefone: 21 2134-5000

e-mail: fredericovallim@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro
– RJ – CEP:

Telefone: 21 2134-5000

e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Participante da pesquisa:

Assinatura do participante da pesquisa

Anexo 6. Aceite no Congresso da ORS (Orthopaedic Research Society) 2016



Dear Dr. Frederico Vallim:

Congratulations! Your abstract has been chosen to be a Paper Presentation at the ORS 2016 Annual Meeting at the Disney's Coronado Springs Resort in Orlando, Florida, March 5-8. Details are listed below.

SESSION DATE & TIME: Saturday Mar 5 2016 1:45 PM - 2:45 PM

SESSION NUMBER: 015

SESSION TITLE: Fracture Healing Biology: Innovative Therapies

PRESENTATION TIME: 1:55pm - 2:05pm

PAPER #: 0106

PAPER TITLE: Atrophic Nonunion Tissue Contains Stromal Cells With Potential To Perform Ossification In Vitro And In Vivo

AUTHORS: Frederico C. Vallim, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, Brazil

ROOM: Coronado K

Anexo 7. Resumo aceito no congresso da ORS 2016

Atrophic nonunion tissue contains stromal cells with potential to perform ossification *in vitro* and *in vivo*

Frederico C. Vallim^{1,2}, Amanda dos S. Cavalcanti³, Rhayra B. Dias^{1,3}, Rafaela C. Sartore³, Ana C. Leal³, Maria Eugenia L. Duarte³, Joao M. Guimaraes², Danielle C. Bonfim^{3,4}

¹Master Program in Musculoskeletal Sciences, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Trauma Center, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Research Division, National Institute of Orthopedics and Traumatology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Craniofacial and Skeletal Diseases Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Maryland, USA

Author Disclosures: All authors state they have no disclosures to declare.

Introduction: Bone has a remarkable capacity to regenerate, completely restoring its original form and function after a fracture. However, bone healing failures resulting in non-union have a mean incidence of 5-10%, and this number may be as high as 30-40% when considering the increasing number of fractures from high-energy trauma. Numerous attempts, such as the injection of bone-inducing factors and/or osteoprogenitor cells, have been made to develop alternative protocols to restore bone formation, however treatment options still remain below expectations. Recent studies have shown that atrophic and hypertrophic non-union tissues contain a cell population with a phenotype similar to Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs), which would be a reminiscent of the fracture hematoma. This finding raised the hypothesis that bone healing could be achieved by the reactivation of these temporally quiescent endogenous stromal cells, which would restart differentiation and perform ossification. However, it remains unclear whether these cells are able to respond to differentiation stimuli and form bone, or if a disturbed microenvironment will impair its differentiation potential. The objective of the present study is to characterize atrophic nonunion tissue stromal cells (NUSC) and evaluate their differentiation potential *in vitro* and *in vivo*.

Methods: Nine patients of both genders, aged 18-65 years, with an atrophic non-union of a diaphyseal femoral (n=3), tibial (n=2) or humeral (n=4) fracture were selected and consented to participate in the study, which was approved by the Institutional Research Ethics Committee. Samples of the non-union tissue, adjacent cortical bone, and iliac crest bone autograft were obtained from each patient during corrective surgery. Non-union and bone tissues were washed with phosphate buffer saline (PBS), mechanically fragmented, and digested with 1% collagenase for 2h at 37°C. Collected cells were resuspended in DMEM containing 10% lot-selected fetal bovine serum (FBS) and counted. 1.0×10^6 cells were plated per 75cm² culture flasks and expanded until passage 3. Iliac crest trabecular bone associated with marrow was washed with PBS and bone marrow suspension was collected after sedimentation of bone spicules. After centrifugation, cell pellets were resuspended in DMEM with 10% FBS and 2.0×10^5 mononuclear cells were plated in 25cm² flasks and allowed to grow for 14 days, at which point adherent cells were harvested and further expanded until passage 3. For immunophenotyping, all cell types were stained with anti-CD105-FITC, -CD90-PerCP, -CD73-APC, and -CD146-PE conjugated antibodies, and analyzed by flow cytometry. The rate of proliferation of each cell type was evaluated by doubling time quantification. After 21 days of treatment with induction cocktails, senescence analysis was performed with β -galactosidase staining and *in vitro* adipogenic and osteogenic differentiation were analyzed through Oil Red O and Von Kossa staining, respectively. For *in vivo* osteogenic potential determination, 1.0×10^6 cells were combined with HA/TCP particles and transplanted subcutaneously into immunocompromised mice. After 12 weeks, transplants were harvested and bone formation was evaluated through H&E staining. After checking for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test, data were compared using One-Way ANOVA and Tukeys Multiple Comparison post-test. Values were expressed as mean $\pm$ SD and *p* values < 0.05 were considered significant.

Results: Similarly to BMSCs and cells obtained from cortical bone (HOBs), nonunion stromal cells (NUSC) had a fibroblastic microscopic morphology (Fig.1, A-C). Proliferative analysis showed that the doubling times of NUSC cultures were similar to BMSCs and HOBs *in vitro* ($9.39 \pm 6.1h$, vs $6.22 \pm 1.12h$ and $7.19 \pm 3.52h$, respectively. *p* = 0.4) (Fig.1D). Also, the number of senescent cells in NUSC

cultures was comparable to the other cell types, as indicated by β -galactosidase activity ($11.06 \pm 8.05\%$ vs $7.27 \pm 5.08\%$ and $8.57 \pm 4.11\%$; $p = 0.64$) (Fig.1E). Flow cytometric analysis showed that NUSCs homogenously expressed CD90 ($97.96 \pm 2.78\%$ vs $94.09 \pm 9.87\%$ for BMSCs and $94.47 \pm 9.21\%$ for HOBs; $p = 0.75$) and CD73 ($99.62 \pm 0.73\%$ vs $99.92 \pm 0.08\%$ for BMSCs and $99.0 \pm 1.65\%$ for HOBs; $p = 0.52$) (Fig.1, F-H). However, a significantly lower amount of NUSC expressing CD105 ($13.56 \pm 8.86\%$ vs $50.26 \pm 21.64\%$ for BMSCs and $28.98 \pm 17.59\%$ for HOBs; $p = 0.03$) and CD146 ($2.12 \pm 2.94\%$ vs $55.59 \pm 39.81\%$ for BMSCs and $4.02 \pm 6.55\%$ for HOBs; $p = 0.01$) was observed in comparison to BMSCs (Fig.1F, I-J). NUSC differentiated along the osteogenic and adipogenic pathways, as evidenced by the deposition of mineralized nodules positive for Von Kossa staining (Fig. 2, A-C) and intracellular lipid accumulation (Fig.2, D-F). When transplanted *in vivo*, NUSC was able to perform heterotopic ossification, generating bone and marrow stroma (Fig.3).

Discussion: It is generally accepted that non-union is a multifactorial condition. However, the exact biological factors contributing to non-union are not completely understood. The observation that non-union tissues contained BMSCs similar cells raised the question of whether these cells could be reactivated endogenously, as a possible strategy to stimulate bone formation through a less invasive, alternative approach.

Our findings show that stromal cells isolated from atrophic non-unions (NUSC) were still able to proliferate and to respond to differentiation stimuli *in vitro*, supporting the hypothesis of endogenous reactivation. Moreover, when transplanted *in vivo*, NUSC reconstituted a whole bone/marrow organ, which is a specific property of cell populations harboring a subset of multipotent cells, known as Skeletal Stem Cells (SSC). Although specific markers of committed osteoprogenitors are currently unknown, and both CD105 and CD146 are modulated during *in vitro* expansion, the decreased proportion of cells expressing these surface markers lead us to hypothesize that NUSC are hierarchically downstream of BMSCs in the osteogenic pathway. It is likely that incomplete bone repair can be attributed to alterations in the environment and in cell signaling, rather than an intrinsic incapability of local stromal progenitors/stem cells to undergo differentiation.

Significance: Due to high rates of patient's morbidity and its contribution to increase costs to the public health system, non-unions are considered a major orthopedic concern. Effective, non-invasive therapeutic strategies to restore bone formation are urgently needed. Further understanding of the mechanisms leading to impaired bone repair would greatly contribute to this achievement.

