

RENNAN LOPES OLIO

**Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal
canino**

São Paulo

2015

RENNAN LOPES OLIO

**Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal
canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Miglino

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3201 FMVZ	<p>Olio, Rennan Lopes Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal canino / Rennan Lopes Olio. -- 2015. 75 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Angelica Miglino.</p> <p>1. Células-tronco mesenquimais. 2. Células-tronco ósseas. 3. Osso fetal canino. 4. Caracterização. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

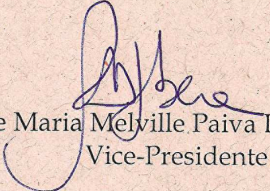
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal canino", protocolado sob o nº 8111230215, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, foi aprovado em de 29/4/2015 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Isolation and characterization of stem cells derived from fetal canine bone", protocol number 8111230215, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Maria Angélica Miglino, was approved in the meeting of day 4/29/2015 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 28 de julho de 2015.


Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
e-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br/comissao-de-etica-www>
<http://orion.fmvz.usp.br/index.php#>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIO, Rennan Lopes

Título: Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, avó e irmão, Rosemeire Lopes, Reinaldo José Olio, Lídia e André Luis Lopes Olio, que trabalharam intensamente para que eu pudesse estar onde estou. Obrigado pela confiança em mim depositada, pelo carinho e pelo amor incondicional! Muito obrigado por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio e pelos conselhos que me foram dados. Sem vocês não conseguiria dar passos tão grandes. Muito obrigado por tudo, sempre!

À minha amada, Juliana Shimara Pires Ferrão por todo amor, carinho, paciência e toda ajuda durante essa fase da minha vida. Amor, obrigado por tudo que você fez nessa caminhada, toda ajuda e força! Muito obrigado por acreditar em mim, e estar do meu lado em todas as horas que eu precisei!

Às minhas filhas, Jujuba e Paçoca, que estavam sempre bagunçando tudo enquanto eu escrevia a dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao pai celestial, que por muitas vezes me ergueu para que eu pudesse continuar em frente!

Aos meus pais e avó, que mesmo longe, estavam presentes nessa caminhada, sempre com todo amor e carinho para que eu seguisse em frente, independente das dificuldades sempre estavam ali para ajudar. Obrigado por me fazerem humilde e sincero como vocês. Muito obrigado por todos os ensinamentos que vocês me deram, conselhos e puxões de orelha.

Ao meu irmão e amigo, os meus sinceros agradecimentos do amor, carinho e apoio que me foi dado. Obrigado Dé, por tudo que você fez e faz por mim, eu te amo maninho!

À minha tia-avó Margo, que me hospedou quando eu cheguei em São Paulo, sempre se preocupando e cuidando de mim; Obrigado por entender a necessidade da minha estadia.

À minha namorada, e amada mulher, que batalhou junto a mim para que essa dissertação saísse, que me ajudou a superar todos os obstáculos, nunca me deixando sozinho e por me incentivar em tudo. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me motivando e me fazendo acreditar mais em mim! Obrigado por ser essa pessoa maravilhosa e essencial na minha vida! A sua paciência e amor estiveram presentes em todos os momentos!

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Angelica Miglino, pela paciência, confiança, seriedade e ensinamentos que permanecerão por toda minha vida; pela orientação e dedicação. Fica aqui registrado meu sincero agradecimento e respeito.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, pela oportunidade concedida de realizar o curso de Pós-graduação.

À Day, pela força desde o começo desta pesquisa, norteamento deste trabalho, ensinamentos e por toda ajuda, desde o começo até o fim. Pelos conselhos e conversas, pela amizade e profissionalismo.

À Paula, pelas conversas, bolachas e chocolates que sempre trouxe! Obrigado pelo carinho e pela ajuda neste trabalho!

À Ana Cláudia, por toda ajuda e dúvidas que foram sanadas. Obrigado pelo tempo precioso que você despendeu para este trabalho.

Ao Phelipe, que me ajudou em muitos trabalhos. Gostaria de agradecer pela sua humildade em nortear os trabalhos que foram feitos no decorrer do mestrado. Obrigado por sempre fazer trabalhar com boa vontade.

À professora doutora Ana Flávia de Carvalho, que deu a oportunidade de entrar para esse mundo científico. Obrigado pelos conselhos, ensinamentos e pela amizade. Muito obrigado!

Aos colegas de laboratório, Bruna, Carla, Carol, Dailiany, Horácio, Jéssica, Adriana, Lara, Luciano, Luciana, Márcio e Rodrigo pelas conversas e que de alguma maneira fizeram parte deste trabalho.

Ao amigo César, diversas vezes eu pude contar com sua ajuda, muito obrigado!

À Paty e ao Pedro, obrigado pelas conversas e conselhos sempre, vocês são pessoas especiais!

Aos amigos, João e Rapha, o “pessoal tá comentando” que vocês são pessoas muito boas. Obrigado pela amizade, pelas conversas, apoio e muita paciência sempre!

Em especial, agradecer à Duda, por emprestar o namorado e pela amizade! Tito, mais que um amigo, é um irmão! Obrigado pelas conversas, apoio e carinho, e obrigado pelo companheirismo de sempre!

Ao Wilson, pessoa mais que especial, alguém que irei guardar no coração para sempre. Obrigado irmão, por tudo que fez por mim! Pelas conversas, pelo carinho, conselho e amizade.

Ao amigo Lúvel, pessoa muito querida que eu tive a oportunidade de conhecer e conviver. Agradeço todos os ensinamentos que me foi passado e toda seu companheirismo.

À minha irmã de apartamento, obrigado Tchê! Você é uma pessoa muito especial. Todas as conversas, o carinho que teve comigo, e paciência! Obrigado Guria!

Aos funcionários do departamento, em especial ao Ronaldo, pelas conversas, conselhos e carinho. Valeu Ronaldão!

À Jaque, que sempre ajudou e teve paciência na secretaria. Meu sincero agradecimento.

À Paulinha, que em todas as manhãs alegrou os meus dias. Por todo seu trabalho no departamento, obrigado!

Aos meus irmãos: Chede, Fred, Felps e Gila, obrigado por existirem na minha vida!

À todos que direta ou indiretamente contribuíram em minha vida e para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela oportunidade e financiamento durante a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Viver é a coisa mais rara do mundo. A maioria das pessoas apenas existe.”

Oscar Wilde

RESUMO

OLIO, R. L. Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal canino. [Obtainment and characterization of stem cells derived from canine fetal bone]. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O tecido ósseo tem sido amplamente estudado devido às suas inúmeras funções e capacidade de auto-regeneração. Entretanto, muitas vezes a reparação óssea completa pode ser prejudicada quando as fraturas ósseas são graves. Muitas pesquisas visando a regeneração do tecido ósseo estão sendo realizadas tanto nas abordagens que envolvem a utilização de enxertos, quanto na aplicação de terapia celular. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar uma linhagem celular proveniente do tecido ósseo de fetos caninos. Para isso, foi realizado método de dissociação enzimática do osso fetal canino para obtenção da cultura celular, estabelecendo assim o cultivo das células OSTBN6. Além disso, foram realizadas técnicas do teste de viabilidade e proliferação celular por MTT, de imunofenotipagem das células, expressão gênica, diferenciação celular em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, e análise do potencial tumorigênico das células derivadas de tecido ósseo fetal canino. Sendo assim, a população isolada de células derivadas de tecido ósseo fetal canino isolada apresentou duas morfologias distintas: formato fibroblastóide e formato triangular. Essas células são viáveis e possuem ótima taxa de proliferação, como indicou o ensaio de MTT. As células foram positivas para pluripotência e para células de origem mesenquimal, e foram negativas para marcadores de células de origem hematopoiéticas. As OSTBN6 foram capazes de se diferenciar em linhagem adipogênica, osteogênica e condrogênica, característica de células mesenquimais. Por fim, foi realizado o teste do potencial tumorigênico em camundongos nude, não havendo formação de tumores. Desse modo, concluímos que a célula proveniente do tecido ósseo fetal canino constitui uma fonte segura para utilização na medicina regenerativa e terapia celular.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, células-tronco ósseas, osso fetal canino, caracterização.

ABSTRACT

OLIO, R. L. **Obtainment and characterization of stem cells derived from canine fetal bone** [Obtenção e caracterização de células-tronco derivadas de tecido ósseo fetal canino]. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Bone tissue has been widely studied due to its numerous functions and capacity for self-regeneration. However, often the complete bone repair may be impaired when bone fractures are severe. Many research aiming to regenerate the bone tissue are being conducted in both approaches involving the use of grafts, as the application of stem cell therapy. The objective of this study was to obtain and characterize a cell line derived from the canine fetuses bone. To do so, it was carried out an enzymatic dissociation method for obtaining canine fetal bone cell culture, thus establishing OSTBN6 cells culture. In addition, there were carried out technical viability and cell proliferation by MTT test, immunophenotyping of cells, gene expression, cellular differentiation in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages, and analysis of tumorigenic potential of cells derived from canine fetal bone. Thus, the population of cells derived from isolated canine fetal bone tissue showed two distinct morphologies: fibroblastoid shape and triangular shape. These cells are viable and have optimal rate of proliferation, as indicated by the MTT assay. Cells were positive for pluripotency and as mesenchymal cells and were negative for hematopoietic origin cell markers. The OSTBN6 were able to differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineage, characteristic of mesenchymal cells. Finally, it was performed the tumorigenic potential test in nude mice, with no tumor formation. Thus, it was concluded that the cell derived from canine fetal bone is a reliable source for use in regenerative medicine and cell therapy.

Keyword: mesenchymal stem cells, bone stem cells, canine fetal bone, characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Método de limpeza da diáfise do fêmur fetal canino.....	34
Figura 2 -	Fotografia das fases de fragmentação, digestão enzimática do colágeno e plaqueamento para aderência dos ossos nas placas de Petri.....	35
Figura 3 -	Micrografias invertidas de cultura primária de fêmur fetal canino.....	45
Figura 4 -	Cultivo celular obtido à partir de tecido ósseo fetal canino.....	46
Figura 5 -	Células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6).....	47
Figura 6 -	Imunofluorescência das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6).....	50
Figura 7 -	Técnica de Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6).....	51
Figura 8 -	Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) da população A.....	52
Figura 9 -	Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) da população B.....	53
Figura 10 -	Citometria de fluxo das células OSTBN6 da população A.....	54
Figura 11 -	Citometria de fluxo das células OSTBN6 da população B.....	55
Figura 12 -	Diferenciação celular em linhagens adipogênica e osteogênica das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6).....	58
Figura 13 -	Potencial tumorigênico das células derivadas de tecido fetal ósseo canino (OSTBN6).....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise de atividade metabólica celular (MTT).....	48
Gráfico 2 -	Citometria de fluxo relacionando as populações A e B de células OSTBN6.....	56
Gráfico 3 -	Análise da expressão de mRNA por qPCR das células de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6).....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Informações sobre os anticorpos utilizados para a imunofluorescência e citometria de fluxo.....	72
Quadro 2 -	Informações sobre os primers utilizados para o qRT-PCR.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	O TECIDO ÓSSEO.....	21
2.2	A ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO.....	22
2.3	COMPONENTES CELULARES	23
2.4	COMPONENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS ÓSSEO.....	24
2.5	PROTEÍNAS E FATORES ENVOLVIDOS NO TECIDO ÓSSEO.....	24
2.6	DESENVOLVIMENTO ÓSSEO	25
2.7	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	26
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL.....	33
5.2	CULTIVO CELULAR.....	33
5.3	ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA (MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT).....	36
5.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	36
5.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR qPCR.....	37
5.6.1	Síntese de cDNA fita dupla	38
5.6.2	Padronização dos primers e da concentração de cdna para qPCR	39
5.6.3	qPCR.....	40
5.7	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	41
5.8	ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	42
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
6	RESULTADOS	45
6.1	OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DOS OSSOS	45
6.2	MORFOLOGIA CELULAR.....	45
6.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	46
6.3	ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA	47
6.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	48

6.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	50
6.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR QPCR	56
6.7	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	57
6.8	ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	59
7	DISCUSSÃO	61
8	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICE A	74
	APÊNDICE B.....	75

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O osso desempenha várias funções importantes no organismo, sendo as principais a formação de um esqueleto rígido para fornecer sustentação para o corpo, suporte para tecidos moles, pontos de fixação para os músculos esqueléticos, proteção para alguns órgãos internos, alojamento da medula óssea, além da homeostase mineral, principalmente de íons de cálcio e fosfato, além de sódio e magnésio (KARTSOGIANNIS; NG, 2004).

É importante ressaltar que o osso é continuamente formado e reabsorvido, mesmo na idade adulta, processo que mantém a homeostase mineral, e também repara microfraturas que ocorrem durante a vida (ZAIDI, 2007; TANG et al., 2009).

O tecido ósseo possui capacidade regenerativa e de renovação que permitem a autorreparação de fraturas. Porém, em algumas fraturas muito graves e extensas, a regeneração completa pode não ocorrer. Atualmente, em casos de regeneração incompleta, o tratamento consiste na inserção de implantes metálicos, os quais tendem a falhar a longo prazo. Além disso, abordagens terapêuticas que consistem na utilização de proteínas morfogênicas ósseas ou proteínas osteogênicas estão sendo utilizadas na área clínica com o intuito de promover a regeneração óssea (BIASIBETTI et al., 2005; DE BIASE; CAPANNA, 2005; KIMELMAN et al., 2006).

Muitos aspectos do tecido ósseo são principalmente estudados em pesquisas envolvendo a cultura celular, que permitem analisar os principais tipos celulares do osso, sendo eles os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. O conhecimento dos fatores que regulam a diferenciação de cada uma destas células, os mecanismos pelos quais fatores influenciam a sua função de regulação, bem como a forma em que essas células se comunicam e interagem, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças ligadas à regeneração óssea (KARTSOGIANNIS; NG, 2004). Atualmente, pesquisas relacionadas aos osteoblastos mostram que os pré-osteócitos e osteócitos têm potencial para se diferenciarem em fontes de osteoblastos (TORREGGIANI et al., 2013).

O uso de células provenientes do osso é muito importante no tratamento de doenças, tais como osteogênese imperfeita, artrose, osteomielite e osteoporose, e em casos em que o osso não funciona adequadamente, mostrando grande relevância sobre o estudo de alternativas para tratamentos e influenciando no impacto clínico e econômico (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009).

O osso é uma importante fonte de células-tronco devido à sua capacidade de autorrenovação e regeneração. Por isso, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar as células derivadas do tecido ósseo como possível fonte de células-tronco para estudos de terapia celular.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O esqueleto exerce algumas funções no organismo, sendo elas, a) a sustentação do corpo, b) a formação do sistema de alavancas utilizado na locomoção e c) a proteção das partes moles. Os fatores biomecânicos são os mais importantes para moldar os ossos e determinar seu desenho microscópico. O principal tecido ósseo, tem papel secundário na manutenção da homeostase mineral do organismo, e possui reserva de cálcio, fosfato e outros íons (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; BILEZIKIAN, 2002; KARTSOGIANNIS; NG, 2004; DYCE; WENSING; SACK, 2010).

Os ossos possuem sua classificação de acordo com suas características, como os ossos longos, que são característicos de membros, tendem a ser cilíndricos e são claramente adaptados ao funcionamento como alavancas. Esses ossos se desenvolvem a partir de três centros de ossificação: um no corpo (diáfise) e um em cada extremidade (epífise) (DYCE; WENSING; SACK, 2010).

O fêmur pertence ao esqueleto apendicular, o qual é composto por ossos dos membros torácicos e pélvicos. Os ossos do esqueleto apendicular formam um núcleo de suporte central dos membros. Embora a interação com o epitélio (a crista ectodérmica apical do broto do membro) seja necessária para a formação dos elementos do esqueleto dos membros, o controle morfogenético dos membros é inerente ao mesoderma, com o epitélio desempenhando um papel de estimulação. Todos os componentes do esqueleto apendicular iniciam-se a partir um modelo cartilaginoso, que se converte para osso verdadeiro pela ossificação endocondral, mais tarde, durante a embriogênese (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

O componente mineral do osso é formado predominantemente por cristais de hidroxiapatita (HAP) e a matriz orgânica desse tecido é semelhante à da cartilagem. Outras características distinguem o osso da cartilagem. As células ósseas (osteócitos) estabelecem contatos entre si e com as células superficiais (osteoblastos) por meio de prolongamentos celulares localizados em pequenos canais (canalículos) na matriz. Além disso, o osso é um tecido extremamente vascularizado (BANKS, 1996).

Os osteoblastos, os osteoclastos e as células fontes do osso estão localizados em membranas de revestimento chamadas perióstio e endóstio. Devido às relações entre o perióstio e o endóstio, todas as superfícies ósseas, exceto algumas nas idades mais avançadas, são revestidas por células (BANKS, 1992; REECE, 2006).

O osso atua como reserva dinâmica (depósito) de cálcio e fosfato e de outras substâncias que se depositam nele. Ele é metabolicamente ativo, estando em constante mudança. As suas células são sensíveis a numerosos e variados estímulos. Diversos hormônios agem de forma “combinada” sobre o osso, influenciando diretamente em sua atividade celular e, indiretamente, sobre sua substância intercelular. As forças mecânicas que atuam sobre ele influenciam a quantidade de tecido ósseo no esqueleto, assim como sua distribuição tridimensional (BANKS, 1992). A estrutura vascular que se forma na osteogênese é muito importante, uma vez que a estrutura sincicial de células e suas conexões estabelecem a arquitetura óssea. Além disso, o desenvolvimento microvascular e da microcirculação é importante para homeostase e regeneração do osso vivo, uma vez que sem essa estrutura vascular o tecido iria se degenerar e morrer (SCHMID et al., 1997; KANCZLER; OREFFO, 2008; TRUETA, 1963).

2.2 A ESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado, fornecendo suporte interno à medula óssea, ocorrendo em todos os vertebrados superiores. É um tecido vivo complexo, onde se mineraliza a matriz extracelular, consolidando a rigidez e resistência ao esqueleto, mantendo certo grau de elasticidade. Morfologicamente existem duas formas de osso: o cortical (compacto) e o esponjoso. A diferença entre os dois tipos está relacionada às suas estruturas e funções. O osso cortical tem função mecânica e de proteção à medula óssea, enquanto que o esponjoso tem função metabólica. Há também duas superfícies, sendo elas, a apical, que é ligada a matriz óssea, e a superfície basal, que está localizada longe da matriz (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008).

O tecido ósseo possui capacidade regenerativa e de renovação que permitem a auto-reparação de fraturas. Porém, em algumas fraturas muito graves e extensas, a regeneração completa pode não ocorrer (BIASIBETTI et al., 2005; DE BIASE; CAPANNA, 2005; KIMELMAN et al., 2006). O TGF-Beta 1 está intimamente ligado à remodelação óssea, pois

há um aumento significativo do mesmo quando ocorre uma fratura. Assim, o TGF-Beta 1 atua no processo de reparação, mantendo a homeostase do tecido ósseo (TANG et al., 2009).

Desse modo, o osso é um órgão e tecido que está em constante renovação e crescimento ativo. Ele contém células de duas linhagens diferentes, sendo elas, as de linhagem osteoblástica e as de linhagem osteoclástica (BANKS, 1992; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

2.3 COMPONENTES CELULARES

O osso é composto por quatro tipos de células diferentes: a) as de revestimento do osso, que estão presentes na superfície óssea, b) os osteoblastos, c) os osteoclastos; e d) permeando o interior mineralizado, os osteócitos. As células de revestimento ósseo, osteoblastos e osteócitos, são provenientes de células osteoprogenitoras, enquanto os osteoclastos são originários de vários tecidos hematopoiéticos (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008).

As células da matriz óssea são morfológica e funcionalmente heterogêneas *in vitro*. Contudo, pré-osteócitos e osteócitos saem das lacunas, uma vez que são móveis, se diferenciam e fornecem fonte adicional de osteoblastos funcionais (TORREGGIANI et al., 2013).

Células como osteoblastos e osteócitos são de origem mesenquimal, com potencial proliferativo e capacidade de diferenciação. As células osteoprogenitoras originam os osteoblastos e estão alocadas na camada interna do perióstio e endóstio. As mesmas persistem por toda a vida como células de revestimento. A linhagem osteoclástica deriva de uma linhagem de monócito-macrófago na medula óssea. Ambas as linhagens são essenciais para a manutenção adequada do esqueleto (BANKS, 1992; KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

2.4 COMPONENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS ÓSSEO

A matriz óssea consiste em 35% de componentes orgânicos e 65% de componentes inorgânicos. A matriz orgânica é composta por colágeno tipo I (90%); proteoglicanos enriquecidos em condroitinsulfato, queratansulfato e ácido hialurônico; e proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteopontina, osteoconectina, sialoproteínas, glicoproteínas e fosfoproteínas), que são sintetizadas pelos osteoblastos e fazem parte do processo de mineralização do osso. A matriz inorgânica é representada pelos depósitos de fosfato de cálcio com características cristalinas da hidroxiapatita. Os cristais estão distribuídos ao longo das fibras colágenas por um processo associado pelas proteínas não colagenosas (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

2.5 PROTEÍNAS E FATORES ENVOLVIDOS NO TECIDO ÓSSEO

A diferenciação e proliferação de células progenitoras mesenquimais em condroblastos e osteoblastos é influenciada por vários agentes de diferenciação, quimiotáticos ou mitogênicos, como TGF-Beta (Transforming Growth Factor), BMPs (Bone Morphogenetic proteins), IGFs (Insulin-like Growth Factor), FGFs (Fibroblastic Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factors) e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Dentre esses fatores de crescimento somente as BMPs são capazes de transformar tecido conectivo em células osteoprogenitoras, enquanto os demais fatores de crescimento induzem à multiplicação de células, mas não transformam uma célula em outra (CAPRA; CONTI, 2009).

Proteínas morfogenéticas do osso (BMP) são citocinas multifuncionais e são membros da superfamília de TGF-Beta. São reguladoras de crescimento, diferenciação, quimiotaxia e apoptose das células e podem induzir unicamente à formação de osso novo tanto *in vitro*, como em sítios heterotópicos *in vivo*. A formação do tecido esquelético é possível através de BMPs durante a embriogênese, o crescimento, a vida adulta e o reparo tecidual (CAPRA; CONTI, 2009).

A diferenciação dos osteoblastos em osteócitos ocorre quando estão nas lacunas no interior da matriz mineralizada produzida por eles. Há participação dos fatores de transcrição Cbfa1/Runx2 e osterix, que estão envolvidos na diferenciação, e também fatores de

crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A expressão do gene *Cbfa-1/Runx2* é induzida pela BMP7, sendo essa proteína o indicador mais precoce de osteogênese, seguido pela expressão de osteocalcina e osteopontina. A osteocalcina é uma proteína de secreção específica, expressa somente nos osteoblastos terminalmente diferenciados sob o controle do *Cbfa-1/Runx2* (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

2.6 DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

Embriologicamente, o osso é derivado de condensações de ossificação intramembranosa ou endocondral (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008; JAYAKUMAR; DI SILVIO, 2010a; HEINEMANN et al., 2011; YOUNG; WOODFORD; O'DOWD, 2013). Na ossificação intramembranosa, o osso é formado através das células mesenquimais, diferenciando-se diretamente em osteoblastos pela expressão de fatores de transcrição, como o fator de ligação nuclear alfa-1 (*Cbfa-1*)/(*Runx2*) gene 2 relacionado runt, *SP7/osterix* (um fator nuclear que contém zinco), *Msx2* e várias proteínas relacionadas ao osso dentro do mesênquima primitivo condensado e vascularizado nos centros de ossificação (YANG; KARSENTY, 2002; KARTSOGIANNIS; NG, 2004; RODDA; MCMAHON, 2006; LANZA; LANGER; VACANTI, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008; CLINES, 2010; JAYAKUMAR; DI SILVIO, 2010).

O osteoblasto prolifera ao redor dos vasos sanguíneos recentemente formados, estabelecendo a matriz óssea e concluindo a formação óssea intramembranosa. Na ossificação endocondral, a cartilagem intermediária inicial é observada nas epífises dos ossos longos embrionários (YANG; KARSENTY, 2002; BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008). Condrócitos expressam colágeno tipo II estabelecendo a matriz cartilaginosa, que consequentemente é penetrada por redes de capilares sanguíneos. Esses vasos sanguíneos que invadem a cartilagem, subseqüentemente são maturados com colágeno tipo X que é produzido por condrocitos hipertróficos. Essa calcificação inicial tem início na matriz extracelular. O crescimento da cartilagem força o eixo da epífise e os osteoblastos invadem progressivamente substituindo a cartilagem. Simultaneamente, osteoclastos formam a cavidade medular e remodelam o osso (RUPANI; BALINT; CARTMELL, 2010).

O epitélio desempenha papel de estimulação no controle morfogenético dos membros inerente ao mesoderma. O fêmur tem início a partir de um modelo cartilaginoso, no qual mais

tarde as células se diferenciam e formam o osso verdadeiro através da ossificação endocondral. A formação dos membros inicia-se com a ativação de um grupo de células mesenquimais no mesoderma somático lateral. Os fatores *T-box*, *Tbx-4* e *Tbx-5* são expressos no mesoderma pré-membro, sendo que eles estão intimamente ligados ao desenvolvimento dos membros, uma vez que tem relação com o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), com a Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e com proteínas Wnt. O mesoderma pré-membro expressa *Hox-8*, necessário para a formação do centro de sinalização do broto do membro inicial, denominado zona de atividade de polarização (ZAP). As células da ZAP secretam ácido retinóico, que estimula a expressão da proteína *Sonic hedgehog* (Shh), a qual controla o estabelecimento do eixo crânio-caudal do membro. Além da Shh, a família de proteínas *Gli* tem importante papel no controle da morfogênese do broto do membro ao longo do eixo craniocaudal (RODRIGUEZ-ESTEBAN et al., 1999; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

2.7 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A principal característica das células mesenquimais em cultura é a capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares como osso, cartilagem e gordura (ZAGO; COVAS, 2006). Uma característica das células mesenquimais é a capacidade de formar colônias e seu aspecto morfológico é fusiforme tipo *fibroblast-like* (DOMINICI et al., 2006; ABDALLAH; KASSEM, 2008).

Trabalhos relacionados à engenharia de tecido ósseo com transplante de células-tronco humanas mostram a importância de tratamentos ligados à biomateriais e enxertos juntamente com células-tronco mesenquimais (MAROLT; KNEZEVIC; NOVAKOVIC, 2010).

As células mesenquimais no nicho de células-tronco do osso recebem estímulos bioquímicos das células circundantes e influenciam as células-tronco mesenquimais (MSCs) a se diferenciarem e tornarem-se precursoras de osso. Os osteócitos têm maior influência em estimular a osteogênese, do que os osteoblastos nas células-tronco mesenquimais (MSCs). Porém os osteoblastos promovem o aumento acentuado no número de células mesenquimais nas fases iniciais, e de fosfatase alcalina tardio, mostrando que os osteoblastos também estimulam a osteogênese, mas de forma lenta. Um mecanismo de co-cultura de três camadas,

mostrou a relação sinérgica entre osteoblastos e osteócitos no estímulo à diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais (BIRMINGHAM et al., 2012).

A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores que incluem betaglicerol fosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destes componentes as células adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina, além de depositar matriz extracelular rica em cálcio (ZAGO; COVAS, 2006).

A diferenciação condrogênica ocorre quando células mesenquimais são cultivadas em ambiente tridimensional em meio de cultura com baixas concentrações de soro fetal bovino e na presença de TGF-Beta. Nestas condições, as células mesenquimais rapidamente mudam a sua morfologia fibroblastóide característica e passam a secretar glicosaminoglicanos, agreganos, fibromodulina, proteína oligomérica da matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II e condroaderina, que são componentes normais e da matriz cartilaginosa normal (BARRY et al., 2001; ZAGO; COVAS, 2006).

A diferenciação adipogênica das células mesenquimais ocorre quando a monocamada celular é cultivada em presença de isobutilmetilxantina, inibidor de fosfodiesterase. Nestas condições ocorre ativação do gene PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma*) e da síntese de ácidos graxos. As células assim cultivadas rapidamente acumulam gotículas de lipídeos no citoplasma (ZAGO; COVAS, 2006).

É importante ressaltar que o desenvolvimento das células, o que inclui osteoblastos e seus precursores e os ossos específicos em que residem, influencia no fenótipo final, no caso o osso, e sua capacidade de ser regulada por moléculas específicas em determinados períodos do seu desenvolvimento, diferenciação e maturação. No caso da calvária (calota craniana), não só os osteoblastos, mas também os pré-osteoblastos e osteócitos diferem na expressão fenotípica nas diferentes zonas de diferenciação que existem nos ossos do tipo plano (laminar), e a ocorrência de progressão das linhagens de células progenitoras de osteoblastos terminais diferenciados e osteócitos podem se diferenciar dependendo em qual camada a célula específica está localizada (AUBIN, 1998).

3 Justificativa

3 JUSTIFICATIVA

O osso é definido como tecido e órgão, e possui funções importantes no corpo humano. Apesar de ser um tecido que está em constante renovação, facilitando a cicatrização em casos de lesão, fraturas mais graves ou localizadas em locais de menor vascularização podem passar por um processo de não-consolidação óssea. Por isso muitos estudos relacionados a regeneração óssea vem sendo realizados com o objetivo de desenvolver novas alternativas terapêuticas que possam melhorar ou facilitar o processo de cicatrização destas fraturas. Portanto, neste estudo caracterizamos e diferenciamos as células derivadas do tecido ósseo de fetos caninos, a fim de estabelecer uma possível fonte para tratamento de injúrias ósseas baseada em terapia celular.

4 Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar as células derivadas do osso fetal canino a fim de identificar populações celulares precursoras.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter culturas de células-tronco de osso fetal oriundas de cães;
- Avaliar o metabolismo celular em cada condição de cultivo para estabelecer o modelo ideal;
- Caracterizar imunofenotipicamente as células derivadas de tecido ósseo de fetos caninos;
- Avaliar a expressão gênica das células derivadas do tecido ósseo de fetos de caninos;
- Descrever a capacidade de diferenciação das células-tronco de tecido ósseo em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas;
- Avaliar o potencial tumorigênico das células derivadas de tecido ósseo fetal canino em camundongos nude.

5 Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

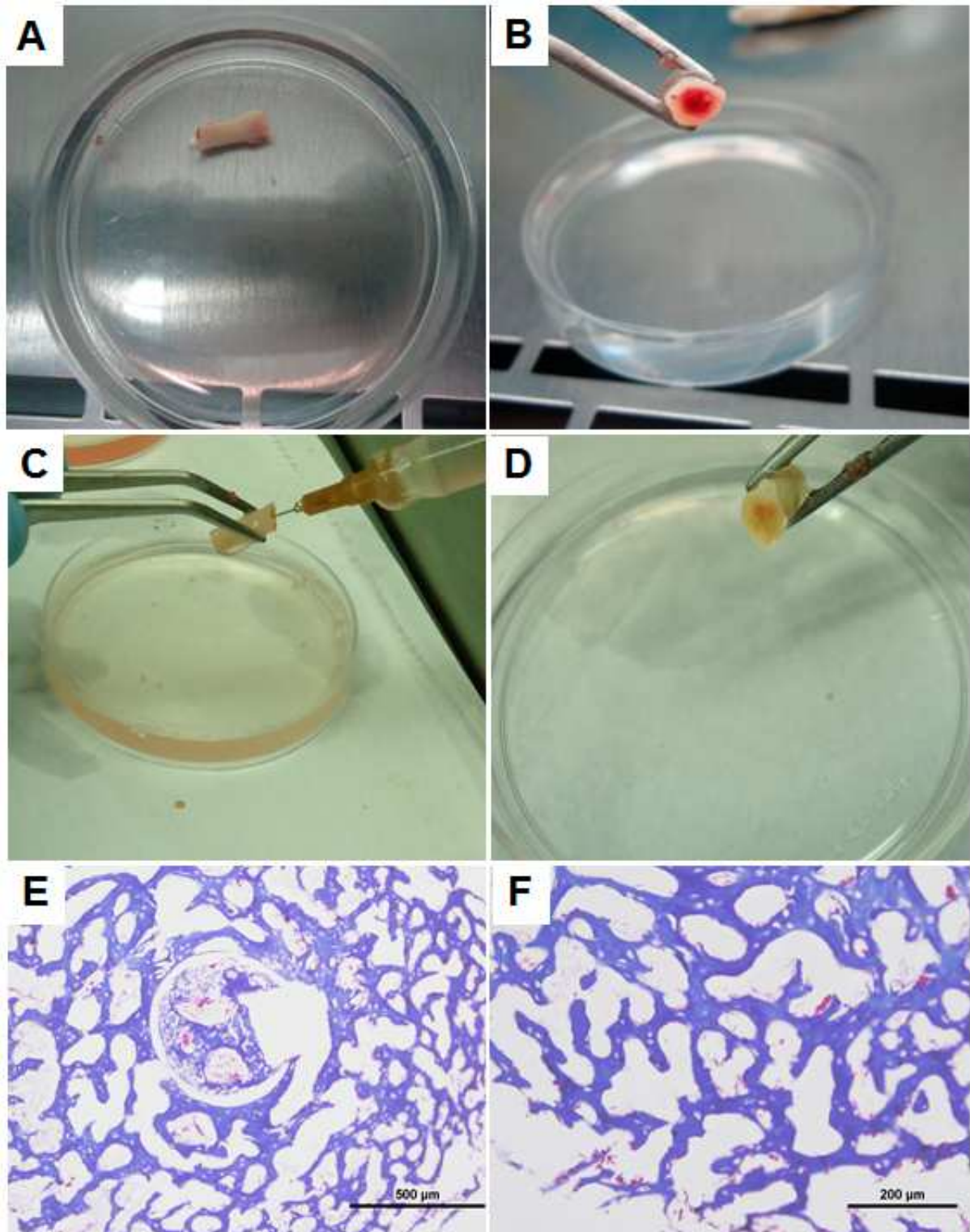
Foram utilizados 10 fetos caninos oriundos de campanhas de castração da região metropolitana de São Paulo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número 8111230215.

5.2 CULTIVO CELULAR

Os membros pélvicos de fetos caninos foram removidos através de desarticulação na região da junta coxofemoral. Os ossos foram isolados através de remoção de tecidos moles relacionados, assim como a medula óssea contida em seu interior (Figura 1). Em seguida foram retirados *flaps* da diáfise do osso com auxílio de bisturi, sendo estes fragmentos colocados em solução de colagenase tipo II (Gibco, EUA) 5mg/ml (Figura 2).

Após a incubação com colagenase, a mesma foi neutralizada com meio de cultura completo, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* ressuspenso em meio completo e colocado em placas de cultura, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo completo utilizado foi ALPHA/MEM (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina.

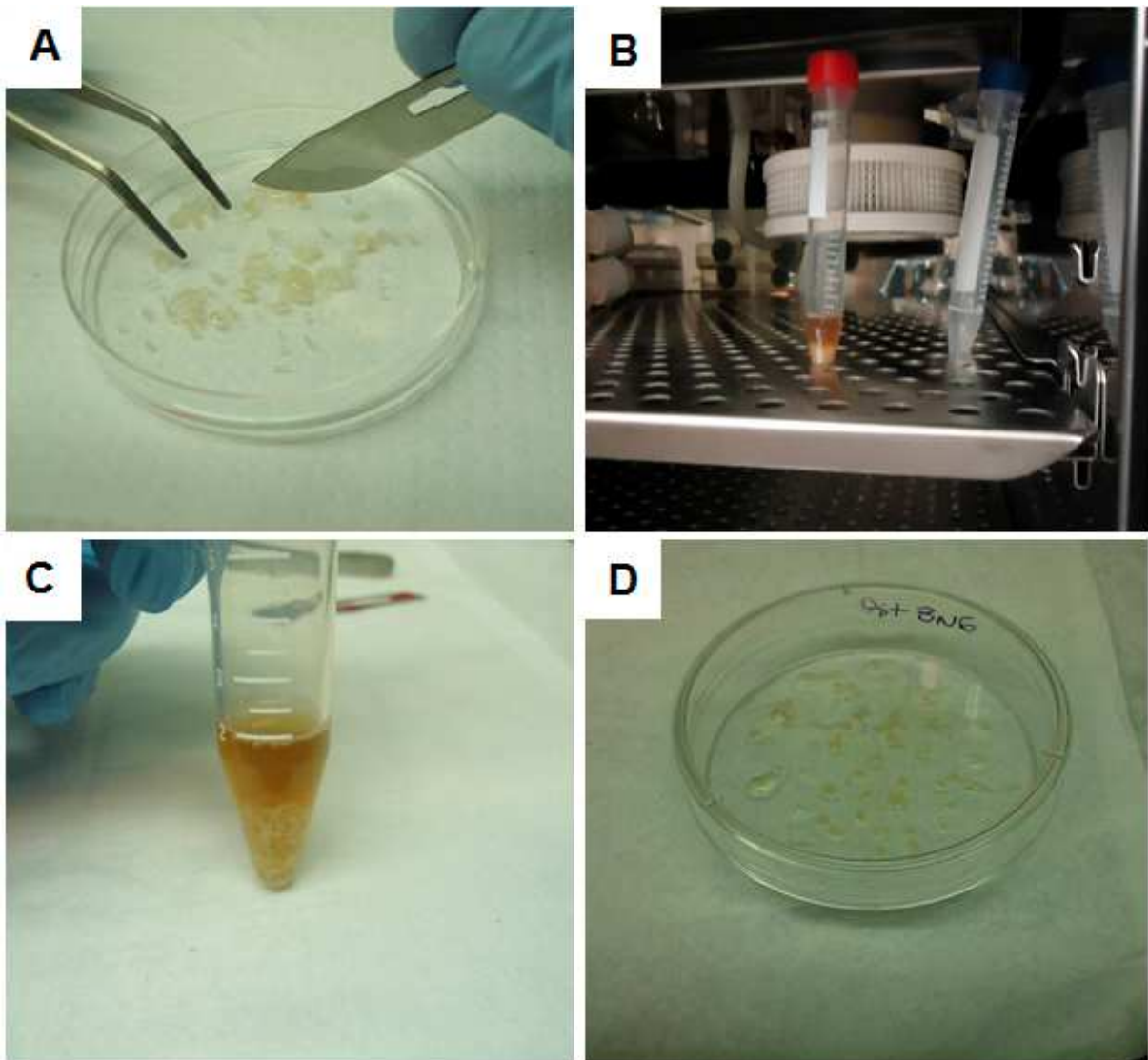
Figura 1 – Método de limpeza da diáfise do fêmur fetal canino



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Fotografia das fases do processo de limpeza de ossos retirados de fetos caninos com 35 dias gestacionais. (A) fotografia do fragmento ósseo após a retirada dos tecidos moles. (B) osso com medula óssea em seu interior. (C) limpeza interna do osso com seringa e agulha utilizando antibiótico (estreptomicina e penicilina) + solução salina (PBS). (D) cavidade medular do osso devidamente limpo no seu interior para que não haja contaminação por células hematopoiéticas. (E e D) microscopia de luz de corte transversal do osso após a limpeza.

Figura 2 – Fotografia das fases de fragmentação, digestão enzimática do colágeno e plaqueamento para aderência dos ossos nas placas de Petri



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Fotografia do método para isolamento de células derivadas de tecido ósseo fetal canino. (A) fotografia da fragmentação mecânica dos ossos obtidos dos fetos caninos. (B) Fragmentos na colagenase para digestão enzimática. (C) após 40 minutos em estufa a 37°C. (D) os fragmentos ósseos são colocados separados em placas de petri juntamente com soro fetal bovino (SFB) para melhor adesão do explante à placa e subsequente início da adesão celular.

5.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA (MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT)

Para estimar o metabolismo celular foi realizada a mensuração da atividade da enzima succinato-desidrogenase mitocondrial. Se ativada, a enzima metaboliza o reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-dipheniltetrazolium bromide] (Sigma, EUA). A análise foi feita com as células derivadas do tecido ósseo fetal canino com a finalidade de analisar a condição ideal de cultivo celular.

A realização do método colorimétrico MTT consistiu no plaqueamento das células em triplicatas (Corning Incorporated, EUA), nos diferentes meios de cultivo a serem testados DMEM-high glucose (LGC Biotecnologia, SP, Brasil), MEM-ALPHA (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) e RPMI (LGC Biotecnologia, SP, Brasil). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 270µl de meio de cultivo e 30µl de solução aquosa de MTT (5mg/l) por poço. As células ficaram incubadas por 3 horas em estufa a 37°C com controle de umidade (maior que 95%) e 5% de CO₂. Ao final da incubação, as placas foram centrifugadas a 2000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 180µl de DMSO (LGC Biotecnologia, SP, Brasil). O conteúdo foi agitado por 15 segundos, seguido da leitura da absorção a 540nm em leitor de ELISA MQX 200 (Bio-Tek Instrumental Inc., EUA).

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células oriundas do tecido ósseo fetal canino foram cultivadas em placas de 24 poços sob lamínula de vidro até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e fixadas em solução de paraformaldeído 4%, durante 15 minutos e lavadas novamente com PBS.

As células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (LGC Biotecnologia, SP, Brasil), durante 15 minutos, depois lavadas com PBS e submetidas ao bloqueio em solução de PBS contendo 5% de soro albumina bovino (BSA), durante 2 horas, em temperatura ambiente.

Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários diluídos 1:100, em duplicatas, em câmara úmida *overnight* a 4°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão de lavagem e os anticorpos secundários (diluição 1:100) marcados com

FITC (Alexa Fluor 488) foram adicionados e incubados, por 1 hora, em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield, com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e a imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80i e no programa *NIS Elements* version 3.22 (Nikon).

Os anticorpos para caracterização das células do tecido ósseo utilizados foram: Oct4, Sox2, PCNA, VEGF, CD34 e CD90 (APÊNDICE A).

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As análises de citometria de fluxo permitiram a caracterização fenotípica das células. Após o desprendimento celular e centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante e acrescentado o tampão FACs Flow; a suspensão foi transferida para tubos de citometria, onde foram adicionados os anticorpos primários e incubados por 30 minutos a 4° C. Após a incubação, foi adicionado o anticorpo secundário, por 30 minutos a 4° C. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão FACS Flow, para aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACS Ariall Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, California, USA), e as aquisições analisadas pelo software FlowJo v.10. A expressão dos marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo FITC ou PE inespecífico. Foram usados os marcadores Oct4, Sox2, Nanog, PCNA, VEGF, Col1A1, CD34, CD45, CD90, CD105, CD117 (APÊNDICE A).

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR qPCR

Os ensaios para PCR quantitativo (qPCR), em tempo real, foram realizados com o objetivo de comparar a expressão dos genes nas células tratadas e controle.

Primeiramente, as células tiveram o seu RNA total extraído. Esses RNAs foram utilizados como molde na reação de transcrição reversa, para a síntese de cDNA fita dupla, conforme descrito abaixo. Os *primers* foram desenhados com a utilização do programa Primer Express v3.0. Como alvos para análise foram utilizados os genes VEGF, RunX2, Oct-4,

Osteopontina, Osteocalcina, Col1 para análise foi utilizado o gene endógeno de cão GAPDH (todos os *primers* estão descritos no APÊNDICE B).

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol. As amostras de homogeneizado de células foram acrescidas de 500µl de Trizol e homogeneizadas, com o auxílio do vórtex. O homogenato foi armazenado a temperatura ambiente, durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos presentes na solução. Após este período, 100µl de clorofórmio foram adicionados (200µl para cada ml de Trizol) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm, a 4°C.

Enquanto isso, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500µl de isopropanol. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para os tubos contendo isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA Total) solubilizado com 1 ml de álcool 75% diluído em água DEPC. Uma nova centrifugação foi realizada, por 5 minutos, 7.000 rpm, a 4 °C. O excesso de álcool foi retirado e o precipitado (RNA Total) solubilizado em 200µl de água tratada com DEPC.

Para a quantificação do RNA total, as amostras foram diluídas na proporção 1:5, ou seja, 40µl de H₂O DEPC foi adicionada 10µl do RNA total e homogeneizada, suavemente. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf), a 260/280nm.

5.6.1 Síntese de cDNA fita dupla

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 1µg de RNA tratado com 2,5mM MgCl₂, 2U DNase I (*RNAse free*, Thermo Scientific), 20U RNaseOUT (Life Technologies) e água deionizada (Milli-Q[®]), em quantidade suficiente para completar 10µL de reação. Esta mistura foi incubada, inicialmente a 37 °C por 10 minutos e depois a 75 °C por 5 minutos.

Adicionou-se, posteriormente, em cada reação, 0,77mM dNTP (Thermo Scientific), 500µg Oligo (dT) primer (Thermo Scientific), 1µl água deionizada e incubou-se por 10 minutos, a 65 °C. A seguir, acrescentou-se à reação: 1X Super Script III Buffer (Thermo Scientific), 5mM DTT (Thermo Scientific), 20U RNaseOUT (Thermo Scientific), 1µl enzima SuperScript III (Thermo Scientific) e 0,5µl água deionizada e incubou-se a 25 °C por 10

minutos, a 55 °C por 2 horas e a 75 °C por 15 minutos. Por fim, foi adicionado a cada reação 1µL RNaseH (Takara) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C e por 10 minutos a 72 °C. Cada amostra (20 µl) foi diluída, adicionando-se 40µl de água deionizada e essas soluções foram armazenadas em alíquotas a -20°C.

5.6.2 Padronização dos *primers* e da concentração de cDNA para qPCR

A padronização dos *primers* por qPCR mostrou que as sequências de oligonucleotídeos escolhidas eram eficientes para a amplificação.

Os cDNAs produzidos foram utilizados em reações de qPCR. Os *primers* usados na amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems), respeitando as seguintes especificações: amplificar fragmentos, cujos tamanhos variem entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não apresentar a capacidade de formar dímero ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C, de acordo com o algoritmo *nearest neighbor*.

Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de *primers* foram desenhados em *exons* diferentes do gene. Para a quantificação do produto formado durante a reação de qPCR, foi utilizado o reagente Fast SYBR[®] Green Dye (Life Technologies) e o aparelho ViiA7 Real Time PCR System (Life Technologies). Para a normalização dos dados, foi utilizado *primer* para um gene de expressão constitutiva, o GAPDH, que atuou como controle interno das reações.

Para tanto, diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 200, 400 e 600nM com misturas de cDNAs diluídas em séries. Com este ensaio, pôde-se determinar a concentração ótima de *primers*, que é caracterizada como a menor concentração onde o Ct e o perfil da curva de amplificação não apresentassem grandes variações em relação às maiores concentrações, com uma menor formação de dímeros de *primers* (quando estes estão presentes). Após escolhidas as melhores concentrações dos *primers*, tanto do gene referência como dos *primers* alvos, a melhor concentração de cada *primer* foi testada com diferentes concentrações de cDNA: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 e 1:480. A análise de regressão linear dos valores de Cts, em função do logaritmo da respectiva diluição, fornece o coeficiente angular

da reta (a, em $y=ax+b$), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

5.6.3 qPCR

Após a padronização dos *primers* (APÊNDICE B), foram realizados os testes de nível de expressão gênica em cada célula, por qPCR, utilizando as concentrações de *primer* e de cDNA escolhidas na padronização. Assim, a expressão do gene-alvo foi determinada em relação a expressão do gene referência *GAPDH*. Após a obtenção dos Cts de cada amostra, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das réplicas.

Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra, que é utilizada como referência, calcula-se, então, a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença é definida como ΔCp . O cálculo do ΔCp é realizado para os dados do gene-alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos *primers* utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{\text{gene alvo}}^{\Delta CP_{\text{gene alvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta CP_{\text{controle endógeno}}}}$$

5.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Aproximadamente 40.000 células (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5.000 células (controle) foram cultivadas em placas de 24 orifícios, contendo lamínulas, em duplicatas. A diferenciação foi iniciada 24 horas após o início do cultivo, com confluência de aproximadamente 80%. Todo o meio de cultura foi removido e em seguida 1mL de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) foi adicionado. Para os controles foi adicionado meio ALPHA-MEM (LGC Biotecnologia, SP, Brasil), acrescido de 7,5% SFB (Invitrogen). As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, durante 21 dias.

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o ALPHA-MEM (LGC Biotecnologia, SP, Brasil), 15% SFB (Invitrogen), suplementado com 10µM de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil), 10µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100mM de indometacina (Sigma-Aldrich). Para os osteócitos foi utilizado o ALPHA-MEM (LGC Biotecnologia, SP, Brasil), 7,5% SFB suplementado com 0,1µM de dexametasona (Decadron injetável), 100µM de ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

Após 21 dias o sobrenadante das células (controle e diferenciadas) foi removido e as células lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos, em temperatura ambiente. Novamente, as células foram lavadas com PBS e seguiram para o protocolo de coloração. Neste caso, o procedimento difere em acordo com o tecido padrão esperado.

As células diferenciadas em linhagem celular foram coradas com a solução de *Alizarin red*, desidratadas em álcool 70%, 90% e 100%. O material foi montado em Permount®.

A diferenciação condrogênica foi realizada utilizando o *kit* STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen). Primeiramente, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente 1x10⁶ células ressuspensas em 2ml de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200rpm, durante 5 minutos e ressuspensas em 2ml do meio de diferenciação do *kit* STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen, preparado segundo instruções do fabricante. O tubo falcon de 15ml foi cuidadosamente colocado com tampa semi-aberta na estufa. O meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de 21 dias.

Após o período de diferenciação, as células foram lavadas em PBS e fixadas em formolaldeído tamponado a 10%, durante 2 horas. Em seguida, foram desidratadas em sequência crescente de alcóois (50%, 70%, 90%), seguidos de 3 banhos a 100%, com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol 100%, com duração de 5 a 10 minutos cada, colocada em banho de Paraplast líquida a 60°C em estufa seca, por 30 minutos, e incluída em Paraplast.

Após inclusão, cortes de 3-4µm foram realizados em micrótomo e as lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°C para fixação do corte. Ao final, as amostras foram submetidas a coloração de Tricômico de Masson.

5.8 ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Foram utilizados dois camundongos Balb-c^{nu/nu}, machos (± 20 g), com 40 dias de idade, para avaliação do potencial tumorigênico. Após subconfluência, 1×10^7 células foram injetadas no tecido subcutâneo da região dorsal cervical do animal. Os animais foram observados por 6 semanas. Após este período, os animais foram submetidos eutanásia e os órgãos (baço, coração, linfonodos, fígado, rim e pulmão) foram coletados para análise histológica coradas com Hematoxilina e Eosina.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística entre os grupos foi feita avaliação dos dados quanto a sua normalidade e variância, para a escolha adequada do teste a ser realizado. Para distribuição normal e variâncias iguais foi aplicado o teste paramétrico ANOVA ou t-Student. Todos os valores foram expressos em média (\pm) desvio padrão (dp), considerando-se como nível crítico para significância valores de $p \leq 0,05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

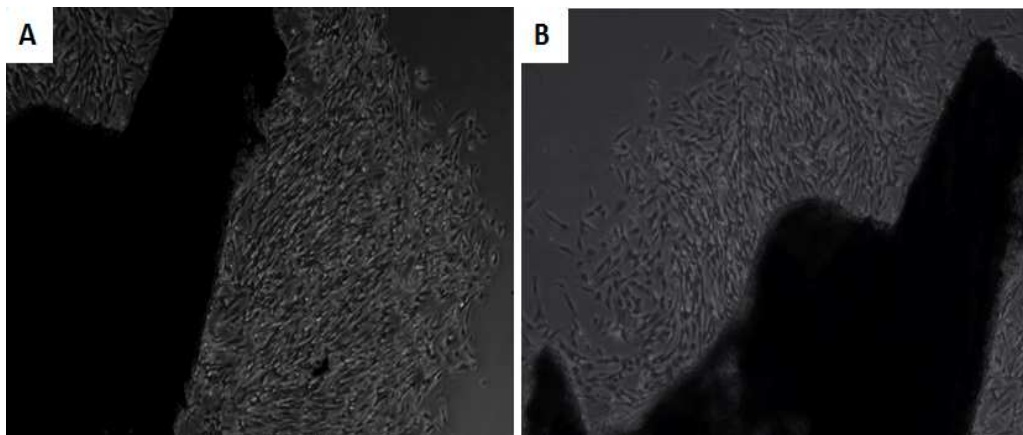
6 Resultados

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DOS OSSOS

Os ossos foram colocados em placas de Petri, juntamente com Soro Fetal Bovino por 24 horas para aderência do material nas placas, sendo em seguida incluso meio Alpha/MEM e, posteriormente, as placas foram incubadas em estufa à 37°C (Figura 3). Após 72 horas do cultivo primário, realizamos a expansão, uma vez que as células estavam confluentes, demonstrando que as células OSTBN6 possuíam boa capacidade proliferativa.

Figura 3 – Micrografias invertidas de cultura primária de fêmur fetal canino



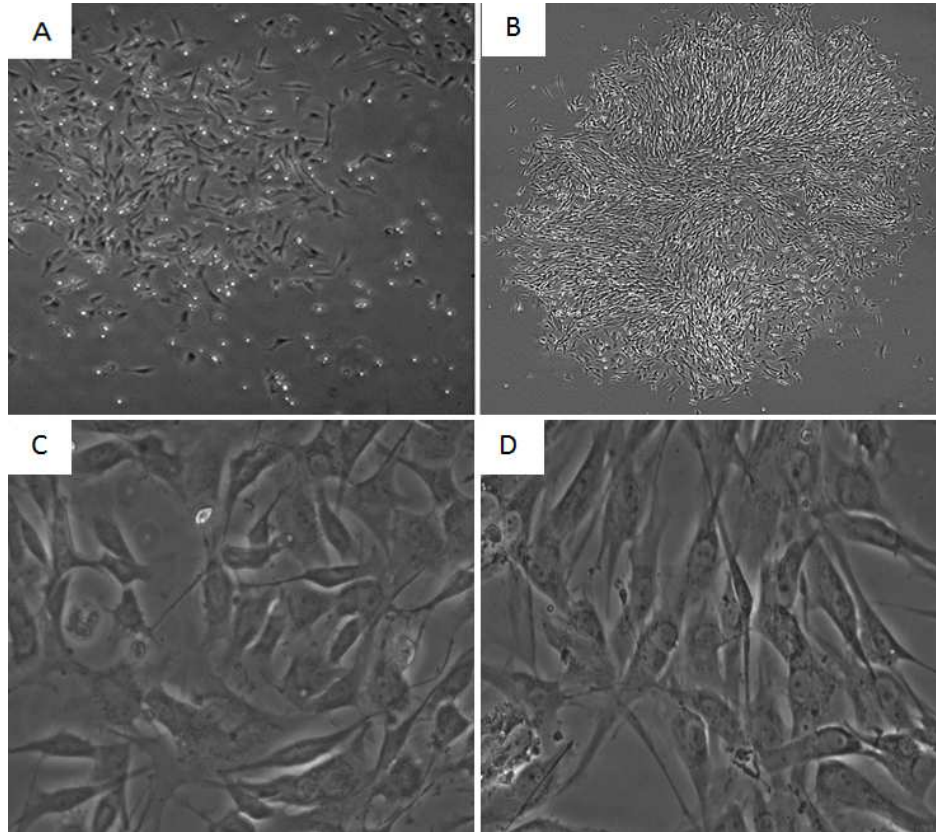
Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Micrografias invertidas de cultura primária. (A) e (B) explante de fêmur fetal canino liberando células após 24 horas. Objetiva de 4x.

6.2 MORFOLOGIA CELULAR

As células derivadas de tecido ósseo fetal canino apresentaram morfologia celular tipo fibroblástóide (*fibroblastic like*) e morfologia triangular (*osteoblastic like*). Na fase de cultura primária as células apresentaram formação de colônias, característica de células-tronco mesenquimais. Isso ocorreu até na primeira passagem dessas células, sendo que nas demais passagens as células não apresentaram formação de colônias (Figura 4).

Figura 4 – Cultivo celular obtido à partir de tecido ósseo fetal canino



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

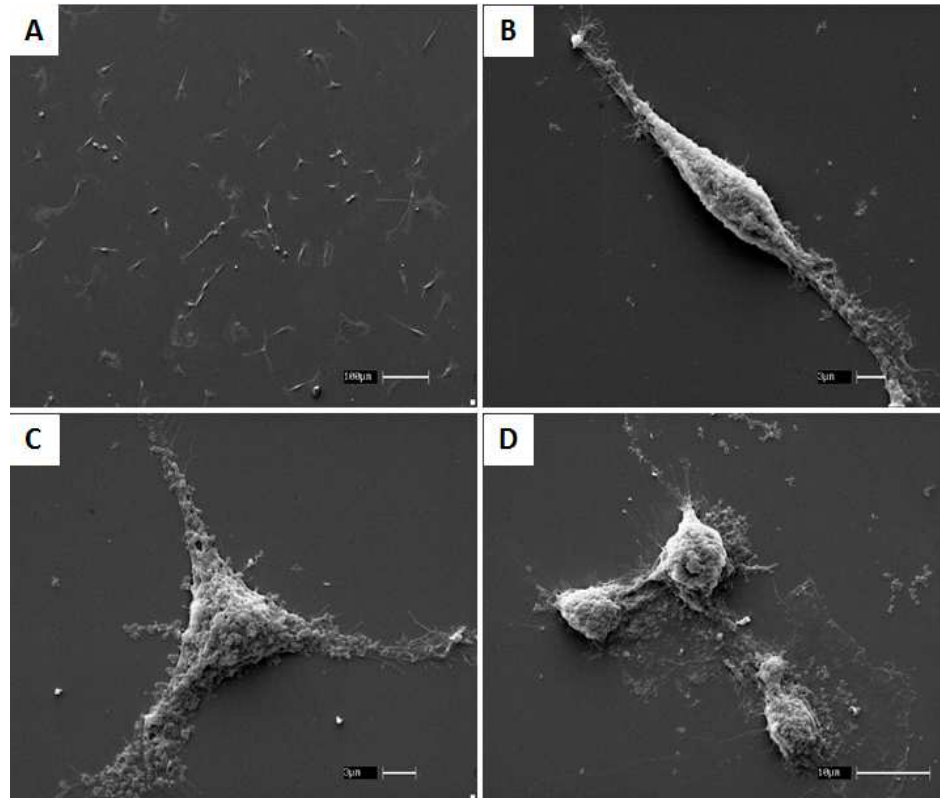
Legenda – Fotomicrografias em microscópio invertido de células obtidas de tecido ósseo fetal canino, feto com 35 dias. (A) e (B) mostram a capacidade das células de formarem colônias, com morfologia heterogênea, em cultura primária. (A) e (B) objetiva de 4x. (C) e (D) cultura em passagem 4 objetiva de 40x.

6.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Além das fotos convencionais no microscópio invertido, foi feita a Microscopia Eletrônica de Varredura. As células derivadas de tecido ósseo fetal canino apresentaram duas morfologias distintas, sendo uma fibroblastóide e outra de formato triangular (Figura 5 - B e

C). Foi possível observar células em apoptose, sem integridade da membrana com aspecto globóide, e perda de adesão ao plástico, onde estavam sendo cultivadas (Figura 5 -D).

Figura 5 – Células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Fotomicrografia no microscópio eletrônico de varredura de células derivadas de tecido ósseo fetal canino. (A) cultura de células oriundas de tecido ósseo fetal canino. (B) célula com característica fibroblastóide. (C) célula com aspecto triangular. (D) célula em apoptose com aspecto globóide.

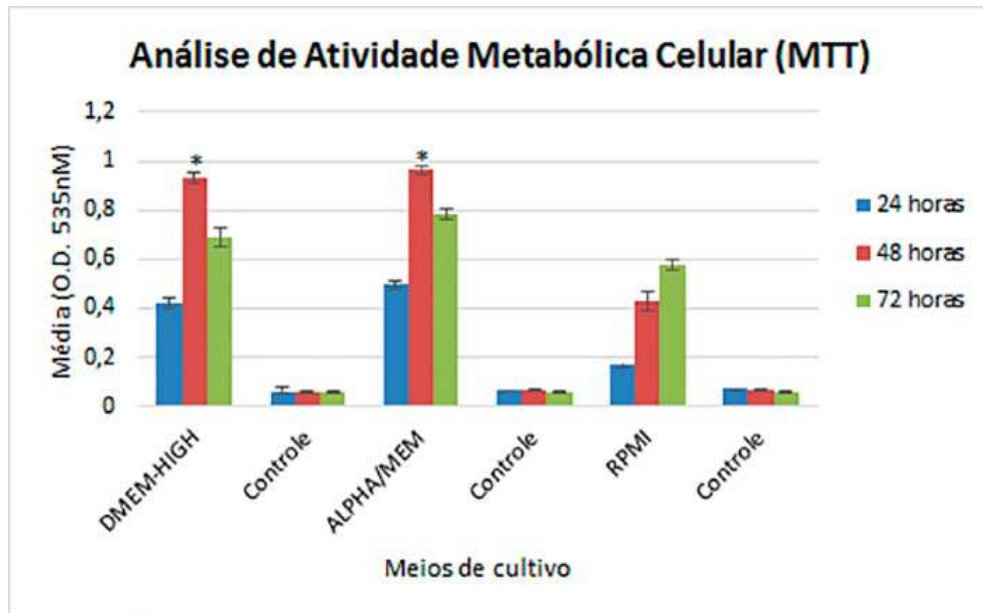
6.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE METABÓLICA

O *kit* de ensaio de proliferação MTT é um ensaio colorimétrico para medir a atividade da redutase mitocondrial em células viáveis e proliferação.

A atividade metabólica das células foi analisada mediante absorção do sal tetrazólico no meio ALPHA/MEM e mostrou-se satisfatória. Após 24 horas a absorção foi maior do que nos outros meios utilizados, sendo que o maior pico de absorção ocorreu em 48 horas, e as células mostraram menor atividade metabólica em 72 horas, devido ao pouco espaço da placa de 96 poços.

Os resultados encontrados com o meio DMEM-High Glucose foram semelhantes aos do meio ALPHA/MEM. A atividade metabólica dessas células não se mostrou satisfatória no meio de cultura RPMI (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise de atividade metabólica celular (MTT)



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – O gráfico representa a análise de absorção do sal tetrazólico pelas células derivadas de tecido ósseo fetal durante 72 horas de ensaio. A análise foi feita a cada 24 horas em meios de cultura diferentes e meio de cultura controle (Alpha/MEM) sem células. As barras representam a média \pm desvio padrão. O asterisco (*) indica diferença não significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de 48 horas.

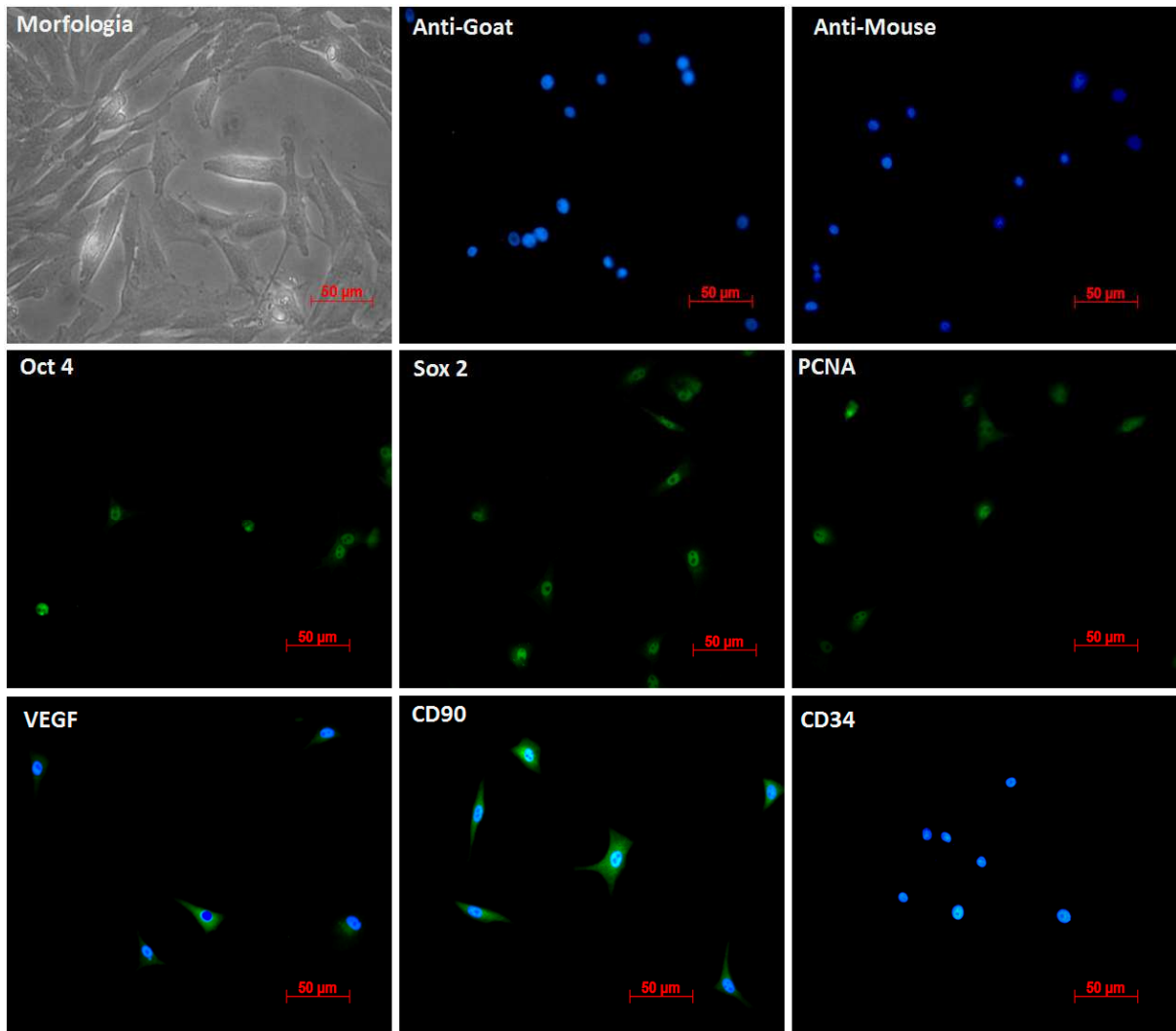
6.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A imunofenotipagem das células oriundas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) foi realizada mediante ensaios de imunofluorescência. Para tanto foram utilizados os seguintes marcadores: Oct4 e Sox2 (pluripotência), PCNA (proliferação), VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), CD90 (origem mesenquimal) e CD34 (origem hematopoiética) (Figura 6).

Com o propósito de avaliar se as células possuem pluripotencialidade, realizamos marcações para Oct4 e Sox2, sendo positivas para ambos marcadores, sendo a marcação nuclear. Para PCNA, o marcador de proliferação foi positivo, também marcação nuclear. A imunopositividade para VEGF é mostrada na Figura 6.

Uma vez que essas células são de origem óssea, realizamos a imunorreatividade para células de origem mesenquimal com anticorpo CD90, sendo a marcação positiva. Contudo, a marcação foi negativa para CD34, demonstrando a ausência de células hematopoiéticas, demonstrando então, característica de células-tronco mesenquimal (Figura 6).

Figura 6 - Imunofluorescência das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)



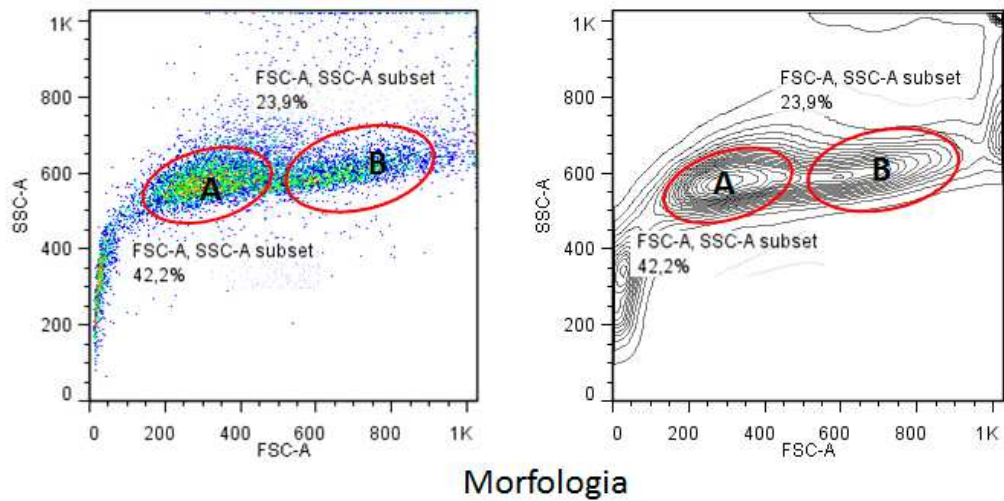
Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – A figura demonstra a morfologia; controle negativo para anticorpo secundário anti-goat e anti-mouse; e o painel de anticorpos: anti-Oct4, anti-Sox2, anti-PCNA, anti-VEGF, anti-CD90 e CD34 utilizados no ensaio de imunocitoquímica/imunofluorescência. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. Objetiva de 40x.

6.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Conforme demonstrado nos resultados referentes à morfologia celular, a cultura celular derivada de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) apresentou duas morfologias celulares distintas (*fibroblastic like* e *osteoblastic like*), sendo este resultado também encontrado na análise de citometria de fluxo. Com a finalidade de avaliar a marcação por anticorpos, a análise da citometria de fluxo foi dividida em populações A e B (Figura 7).

Figura 7 – Técnica de Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)

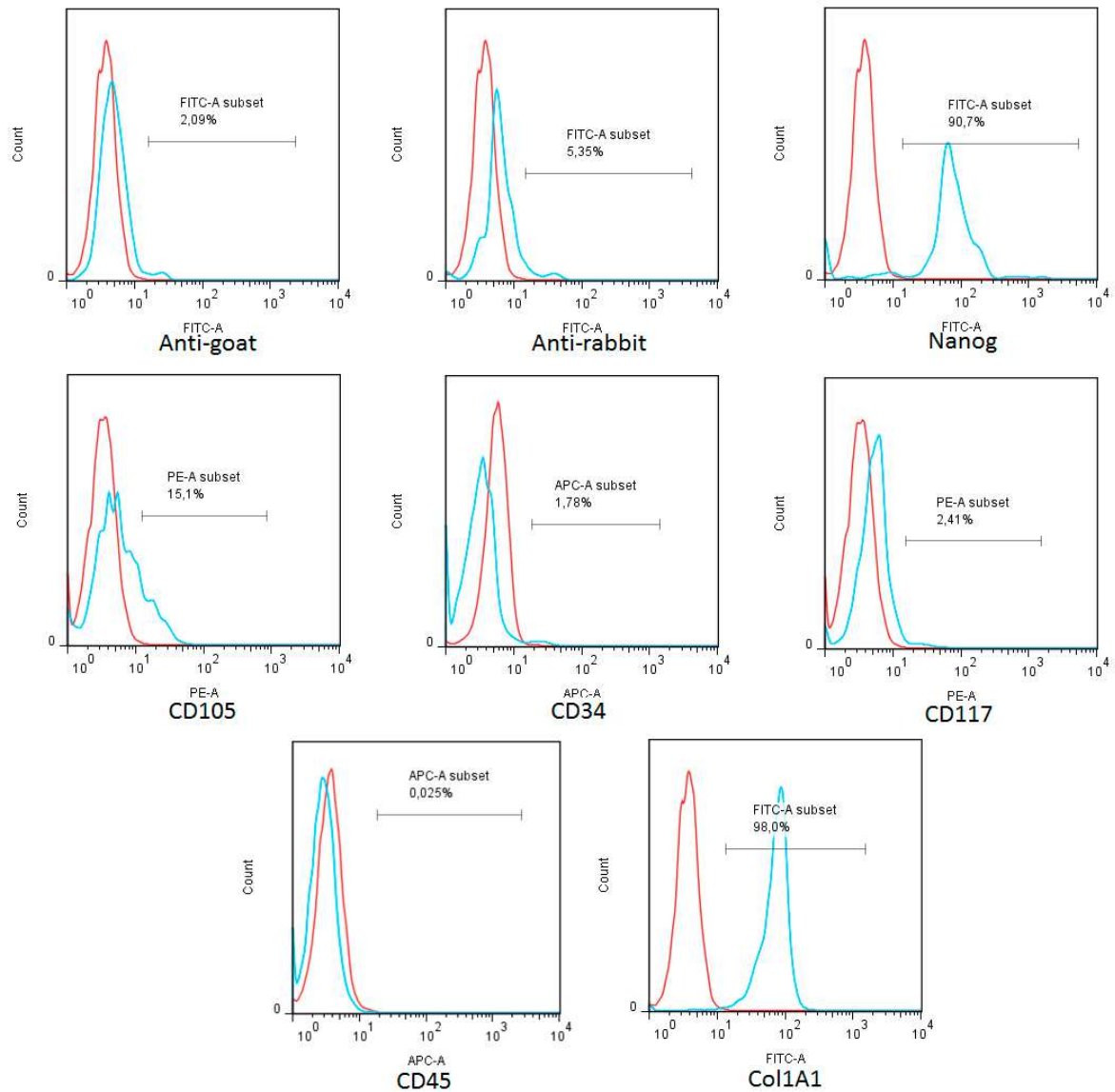


Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Populações A e B selecionadas para avaliação da marcação.

Foi realizada a caracterização das células por citometria de fluxo utilizando-se os anticorpos Oct4, Nanog, SOX2, PCNA, VEGF, CD34, CD45, CD90, CD 105 e CD117. As marcações demonstram que as células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) foram positivas para marcadores de pluripotência (OCT4, NANOG e SOX2), proliferação celular (PCNA), angiogênese (VEGF), marcadores de células mesenquimais (CD90 e CD105) e colágeno I. Contudo, foram realizadas marcações com anticorpos para células de origem hematopoiética, sendo esses anticorpos o CD34, CD45 e CD117. As marcações foram negativas para essas marcações, confirmando então, os dados obtidos pela imunofluorescência (Figuras 8 a 11).

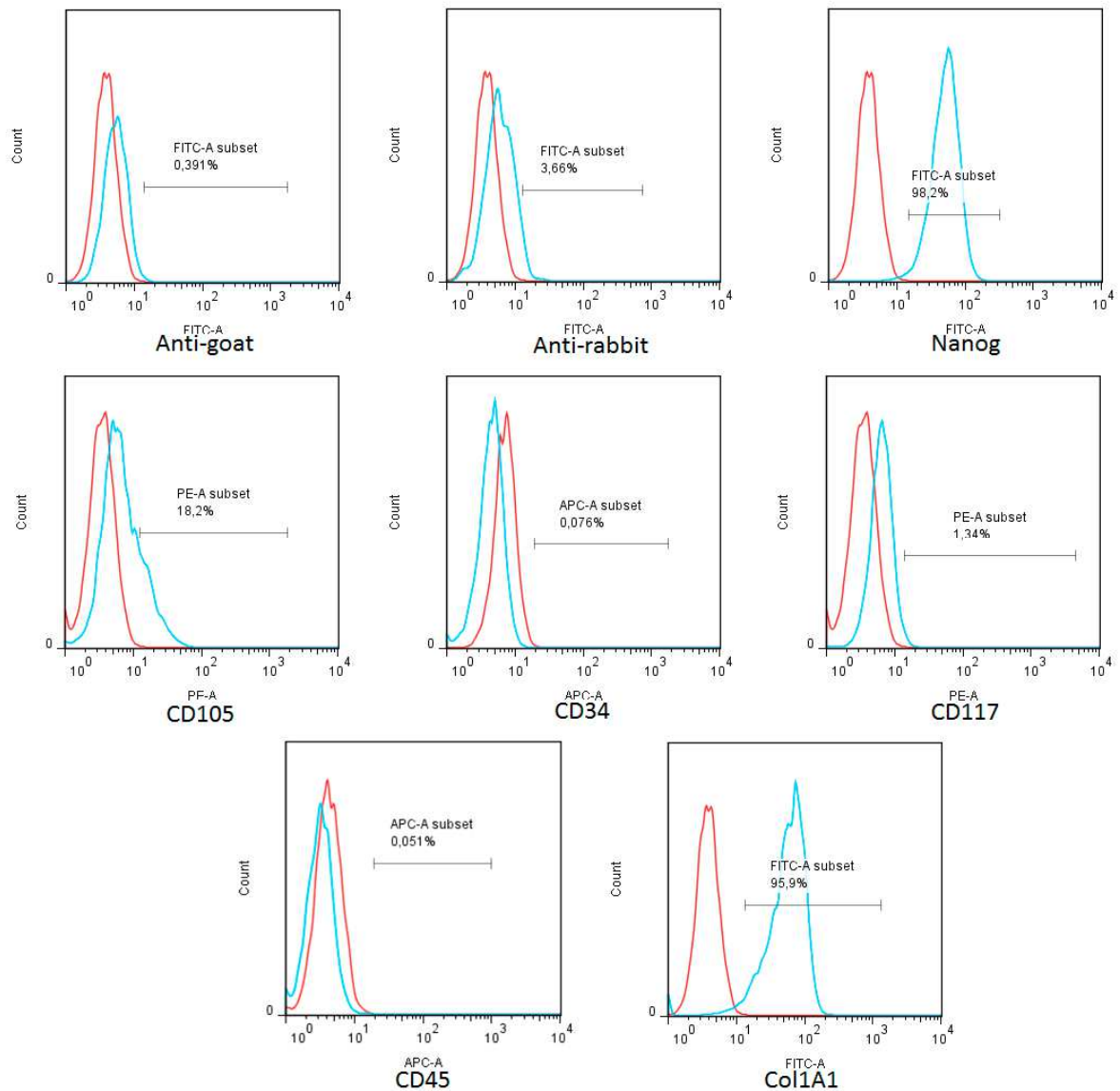
Figura 8 - Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) da população A



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Histogramas representativos da população A para os marcadores Nanog, CD105 e Col1A1 (curvas azuis) expressos e os marcadores CD34, CD117 e CD45 (curvas azuis) não expressos em células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6). Na figura é mostrado o controle negativo (curvas vermelhas) das células para os anticorpos secundários anti-goat FITC e anti-rabbit FITC.

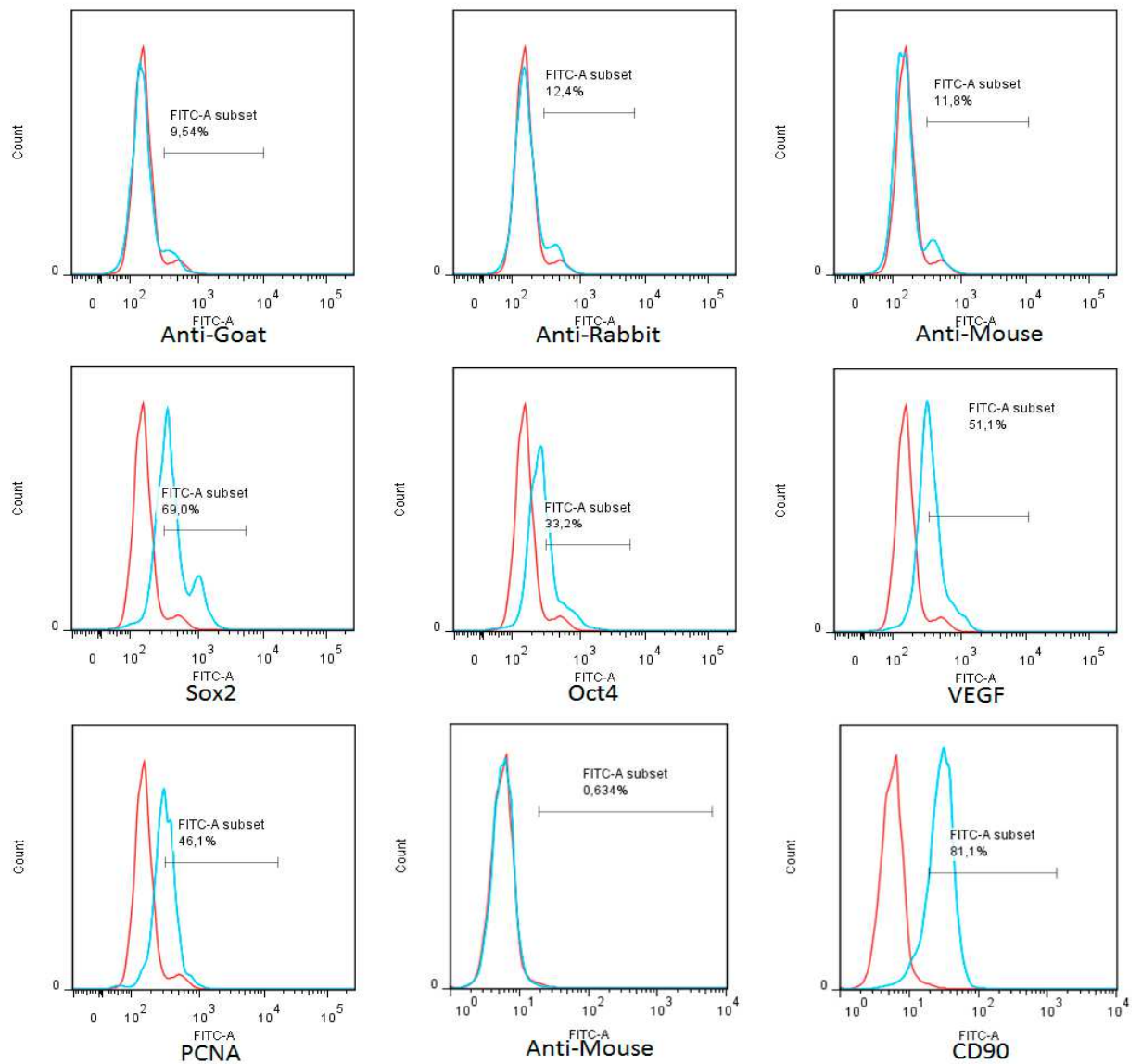
Figura 9 - Citometria de fluxo das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) da população B



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Histogramas representativos da população B para os marcadores Nanog, CD105 e Col1A1 (curvas azuis) expressos e os marcadores CD34, CD117 e CD45 (curvas azuis) não expressos em células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6). Na figura é mostrado o controle negativo (curvas vermelhas) das células para os anticorpos secundários anti-goat FITC e anti-rabbit FITC.

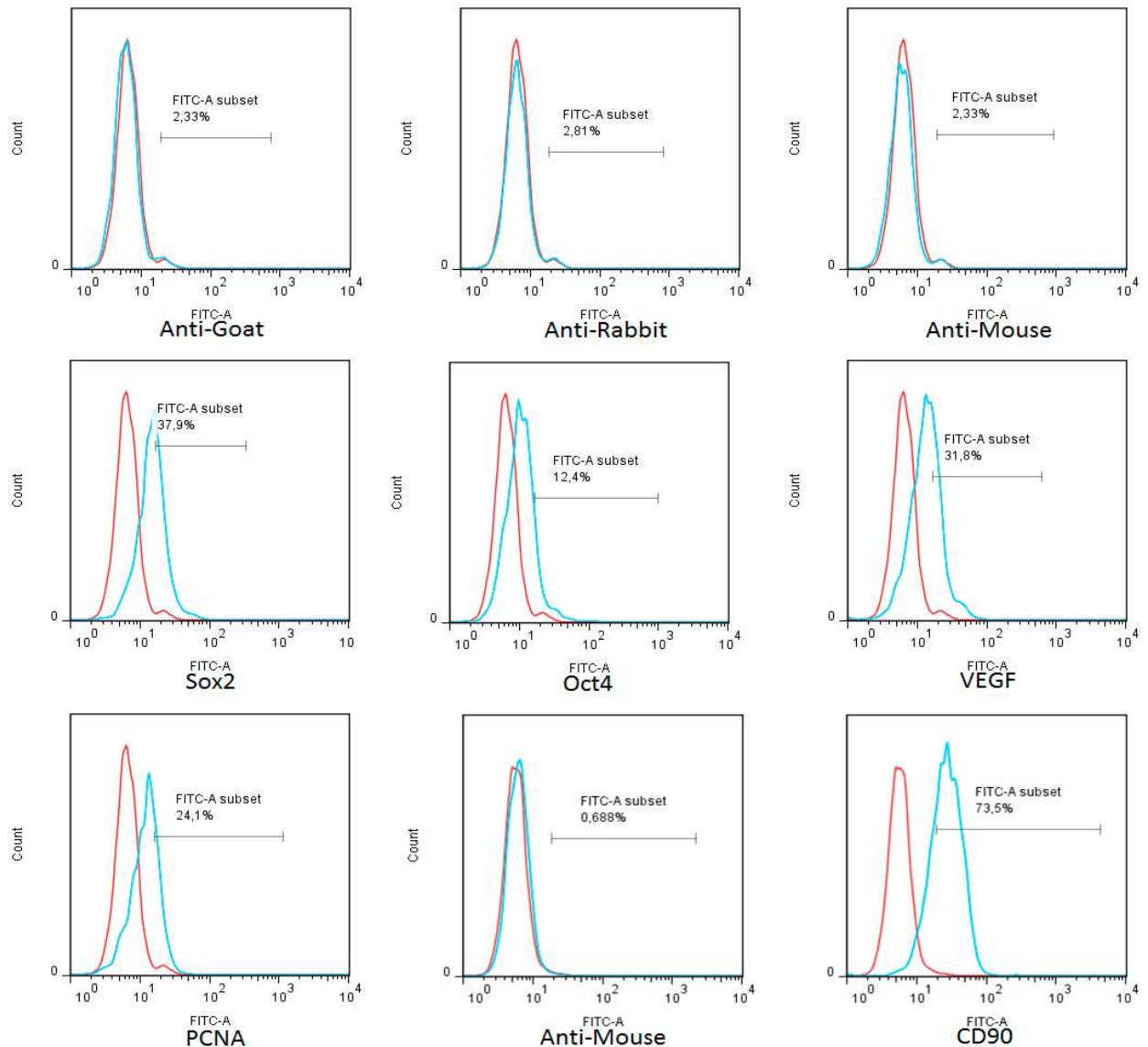
Figura 10 - Citometria de fluxo das células OSTBN6 da população A



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Histogramas representativos da população A para os marcadores Sox2, Oct4, VEGF, PCNA e CD90 (curvas azuis) positivos para células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6). É mostrado na figura a morfologia e o controle negativo (curvas vermelhas) das células para os anticorpos secundários Anti-Goat, Anti-Rabbit e Anti-Mouse FITC.

Figura 11 - Citometria de fluxo das células OSTBN6 da população B



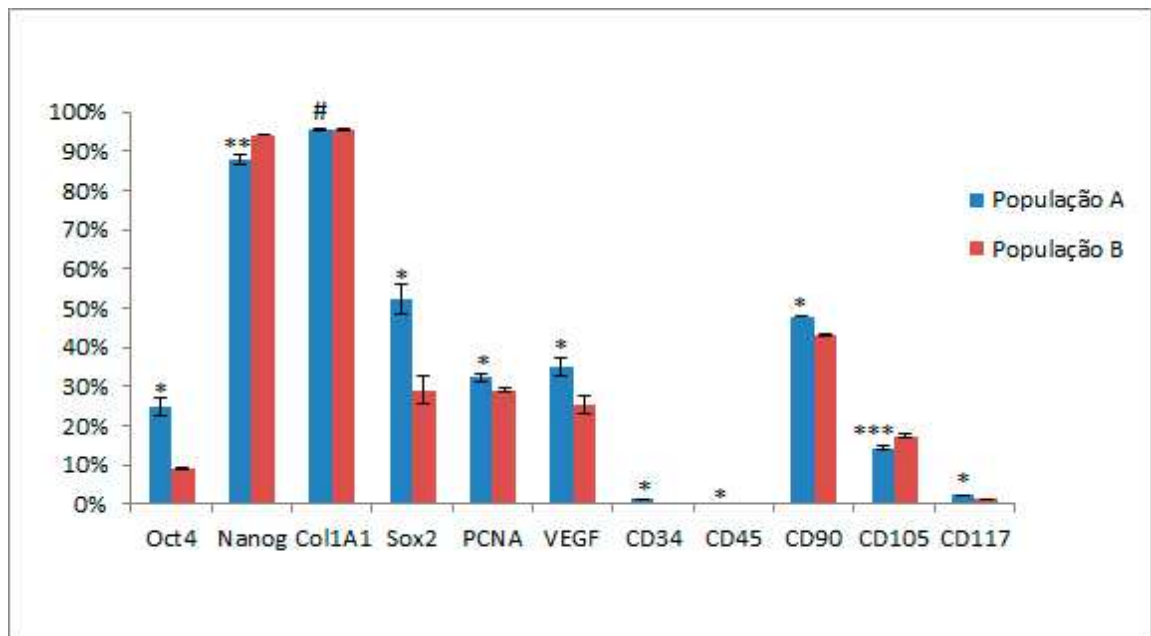
Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Histogramas representativos da população B para os marcadores Sox2, Oct4, VEGF, PCNA e CD90 (curvas azuis) positivos para células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6). É mostrado na figura a morfologia e o controle negativo (curvas vermelhas) das células para os anticorpos secundários Anti-Goat, Anti-Rabbit e Anti-Mouse FITC.

A análise estatística foi realizada com o objetivo de analisar a presença de diferença da marcação significativa entre as populações (A e B), sendo que as marcações positivas para os anticorpos Nanog, Sox2, Oct4, PCNA, VEGF, CD90 e CD105 obtiveram diferenças estatísticas significativas ($p=0,001$; $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p=0,0002$, respectivamente). No entanto, o Col1A1, também positivo, não obteve diferença estatística significativa ($p=0,7908$) entre as duas populações.

Para os marcadores CD34, CD45 e CD117 a marcação é considerada negativa, pois a porcentagem marcada foi menor que 2%, tornando-se, assim, insignificante. No entanto, estatisticamente apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) na comparação entre as duas populações (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Citometria de fluxo relacionando as populações A e B de células OSTBN6



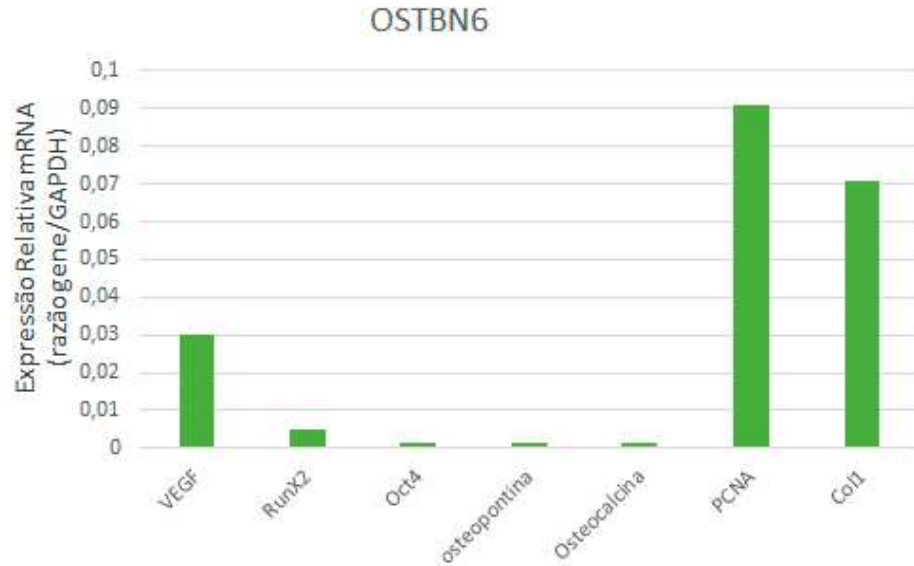
Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Marcações das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6) por citometria de fluxo, relacionando as diferentes populações (A e B). Análise estatística da variância de t-Student ($*p < 0,0001$; $**p = 0,001$; $***p = 0,0002$; $\#p > 0,05$).

6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

A análise da expressão de mRNA por qPCR demonstrou expressão significativa dos genes PCNA, Colágeno I e VEGF. Os demais genes Runx2, OCT4, Osteopontina e Osteocalcina foi positiva, porém menor que os outros genes. A expressão do gene PCNA foi alta, demonstrando que as células OSTBN6 possuem potencial proliferativo (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Análise da expressão de mRNA por qPCR das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – O gráfico representa a expressão relativa de mRNA para os genes VEGF, RunX2, OCT4, Osteopontina, Osteocalcina, PCNA e Colágeno I.

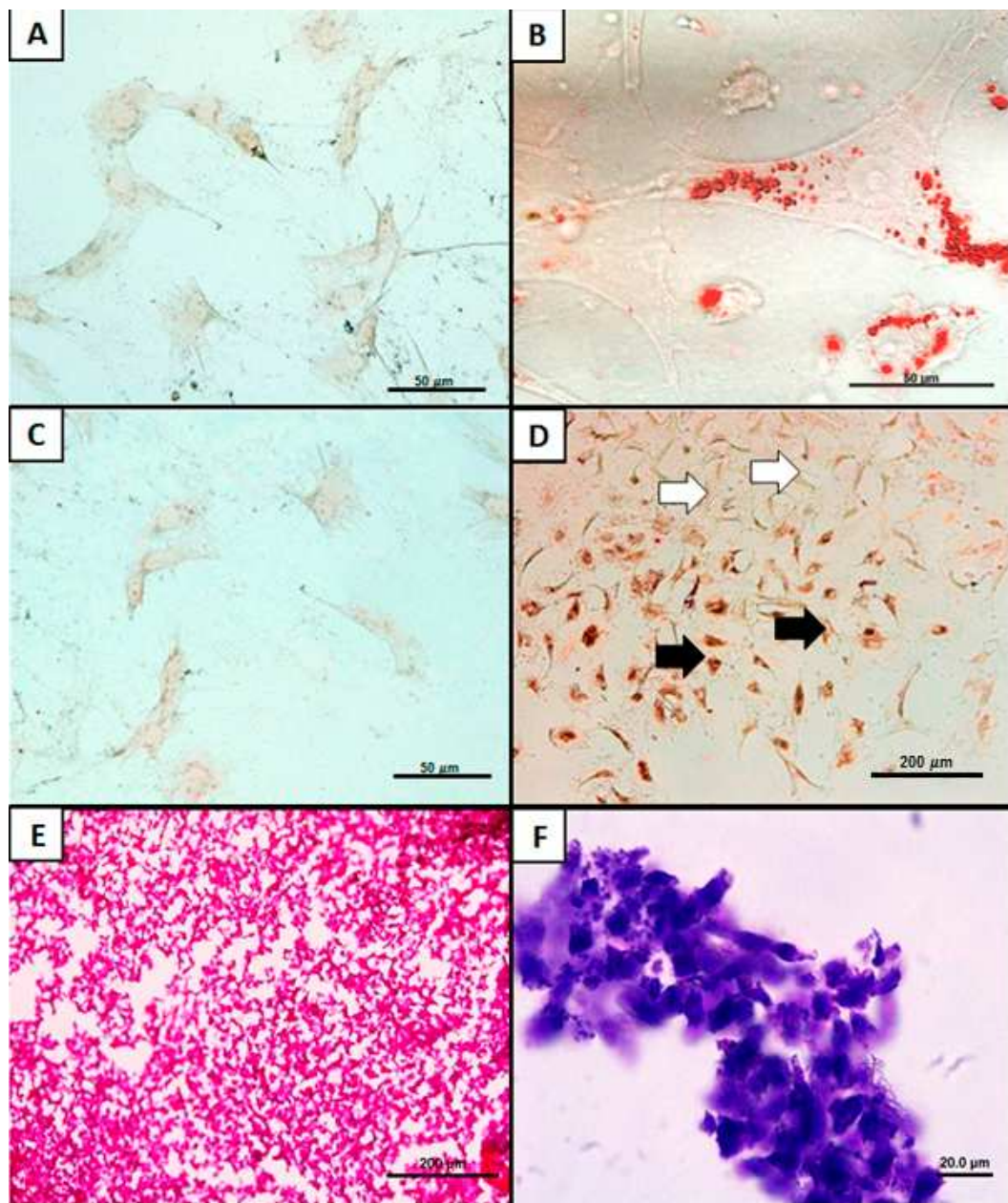
6.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Após os 21 dias de diferenciação adipogênica foram observadas, ao microscópio invertido gotículas nas células e, então, realizou-se a coloração com *oil red*, possibilitando assim a confirmação das gotículas de lipídeos (Figura 12).

Para a indução osteogênica, após os 21 dias de cultura, as células foram submetidas a coloração por *Alizarin red*, através da qual puderam ser visualizados depósitos de cálcio em arranjos irregulares sobre as culturas derivadas de tecido ósseo, indicando sucesso da indução osteogênica (Figura 12).

A diferenciação condrogênica foi evidenciada pela formação de colágeno I. Após 21 dias de cultura, houve o processamento histológico do pellet celular e as células foram submetidas a coloração de Tricrômico de Masson, o que possibilitou a coloração azulada, indicando a presença colágeno.

Figura 12 - Diferenciação celular em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica de derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)



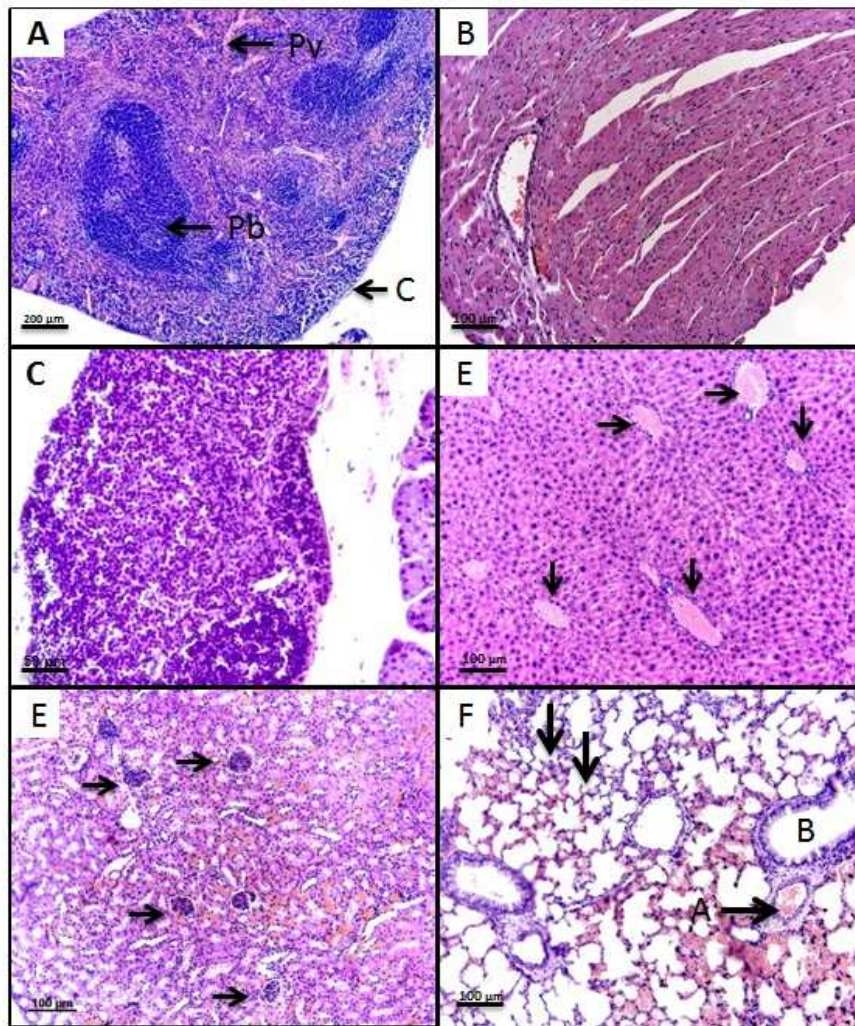
Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – Fotomicrografias das células derivadas de osso fetal canino após a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. (A) células controlesem gotículas de lipídios. (B) acúmulos de gotículas lipídicas evidentes, células submetidas a coloração *Oil Red*. (C) células controle da diferenciação osteogênica sem depósitos de cálcio. (D) células que sofreram diferenciação osteogênica com evidente depósito de cálcio (**Setas**), submetidas a coloração *alizarina red*, algumas células apontadas pelas Setas sem preenchimento são células que não apresentaram depósito de cálcio. (E) células controle para diferenciação condrogênica, submetidas a coloração Tricrômico de Masson. (F) tricrômico de masson evidenciando a diferenciação condrogênica.

6.8 ANÁLISE DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Para a avaliação do potencial tumorigênico das células derivadas do tecido ósseo fetal canino OSTBN6, foi realizada a inoculação de 1×10^7 de células em camundongos imunossuprimidos (Nude). Os animais foram mantidos em cativeiro por 6 semanas e ao final desse período foi realizada a eutanásia para a coleta dos seguintes órgãos: baço, coração, linfonodo, fígado, rim e pulmão, sendo que não apresentaram nenhuma alteração morfológica, e não houve formação tumoral (Figura 13).

Figura 13 - Potencial tumorigênico das células derivadas de tecido ósseo fetal canino (OSTBN6)



Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

Legenda – (A) Baço (objetiva de 10x) - Polpa vermelha (Pv), Polpa branca (Pb) e a Cápsula (C) de revestimento. (B) Miocárdio (objetiva de 20x) - fibras não apresentam alterações. (C) Linfonodo (objetiva 40x). (D) Fígado (objetiva 20x) - veias centrais (seta). (E) Rim (20x) - glomérulos na região medular (setas) revestidos pela cápsula de Bowman. (F) Pulmão (20x) - alvéolos (setas) e artéria (A) ao lado do bronquíolo (B).

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais constituem ótima fonte de estudos, por possuírem características intrínsecas de auto-renovação e diferenciação em linhagens celulares adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, indicando que são promissoras na aplicação para regeneração de tecidos tais como traumas ou fraturas, de ossos e/ou cartilagens. São também utilizadas na bioengenharia e transplante celular (ZAGO; COVAS, 2006; PAPATHANASOPOULOS; GIANNOUDIS, 2008; SUNG et al., 2008; MAROLT; KNEZEVIC; NOVAKOVIC, 2010).

As células derivadas de tecido ósseo fetal canino são facilmente isoladas e cultivadas. A metodologia simples faz com que 72 horas após o cultivo primário, possa ser realizada a expansão das mesmas, ao contrário de alguns estudos realizados com células derivadas de epífises e calvária, as quais requerem um tempo maior de até oito semanas (BINDERMAN et al., 1974; LEVY et al., 1988; CHENG et al., 2012). Cheng et al. (2012) fizeram isolamento de células derivadas de epífises de fêmur e tíbia de camundongos. As células confluíram na placa com sete dias de cultura, e no isolamento não utilizaram nenhum produto para digestão enzimática. Levy et al. (1988) isolaram células derivadas de cartilagem epifisária da tíbia de ratos. O tempo para confluência celular na placa de cultura era de 10 a 14 dias nas placas, sendo usada colagenase para digestão enzimática do tecido. No entanto, Binderman et al. (1974) isolaram células derivadas de periósteo e da calvária de ratos, sendo que as células de seu cultivo primário permitiram confluência celular em até 8 semanas, e foi empregada em sua metodologia uma solução de tripsina-EDTA nos tecidos do isolamento. Contudo, o presente estudo demonstrou que as células derivadas de tecido ósseo fetal canino apresentaram boa proliferação em comparação aos trabalhos citados, já que ocorreu confluência das células na placa em 72 horas após adição do meio de cultura. A metodologia usada foi semelhante a Levy et al. (1988), uma vez que no presente trabalho foi usada a colagenase para digestão enzimática dos fragmentos ósseos.

A morfologia das células derivadas de tecido ósseo fetal canino é predominantemente fibroblásticoide e triangular como demonstrado nos resultados da cultura e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e nos resultados de Cheng et al. (2012). Além dos dois aspectos morfológicos os pesquisadores também descreveram uma terceira morfologia, a fusiforme. Tal resultado pode ser devido a fonte de extração das células, uma vez que Cheng et al. (2012) isolaram as células a partir de epífise de fêmur, e no presente trabalho as células

foram isoladas a partir da diáfise do fêmur. Os mesmos resultados observados nas morfologias distintas em cultura podem ser comprovados pela citometria de fluxo.

O teste colorimétrico por MTT é feito para avaliar a atividade metabólica das células, onde as mitocôndrias ativas fazem a clivagem do MTT, demonstrando o potencial ativo dessas células. Além da atividade metabólica, o MTT indica proliferação e a viabilidade celular, uma vez que o MTT só é metabolizado por células vivas (MOSMANN, 1983). O teste de atividade metabólica foi feito utilizando diferentes meios de cultura, dentre eles o MEM ALPHA, DMEM-HIGH Glucose e RPMI, no sentido de avaliar o melhor meio de cultivo para as células OSTBN6. Não houve diferença significativa entre os meios MEM ALPHA e DMEM-HIGH Glucose, bem como demonstram Li et al. (2009) em seu trabalho, que fizeram a utilização desses meios de cultura. No entanto, no meio de cultura RPMI não ocorreu proliferação celular satisfatória.

Foram observadas duas populações celulares morfologicamente distintas que diferiram na expressão de marcadores para pluripotência, proliferação celular e angiogênese, sugerindo que estas populações se encontram em diferentes fases de crescimento.

No presente estudo, as marcações para Oct4 e Sox2 foram realizadas por citometria de fluxo e imunocitoquímica por fluorescência, sendo ambas foram positivas para esses marcadores, nas duas populações encontradas, corroborando com os achados de Izadpanah et al. (2006), que demonstraram marcação positiva para Oct4 e Sox2 em células mesenquimais derivadas de medula óssea e tecido adiposo humanas e de macaco *Rhesus*. Oct4 juntamente com o Sox2 são genes reguladores que agem durante o desenvolvimento embrionário (PESCE et al., 1998; PESCE; GROSS; SCHÖLER, 1998; IZADPANAHA et al., 2006). A expressão de Oct4 tem papel principal para os fatores de transcrição na especificação e manutenção de células pluripotentes tanto *in vivo* quanto *in vitro* (NIWA, 2001; IZADPANAHA et al., 2006). Além disso, Greco, Liu e Rameshwar (2007) demonstraram que o Oct4 possui mecanismos regulatórios semelhantes em células-tronco mesenquimais e embrionárias (MSCs e ESCs), uma vez que o mesmo tem implicações na plasticidade celular e na expressão dos genes mesodermiais.

Ohnishi, Yuba e Ohgushi (2011) demonstraram que o Sox2 e o Nanog são importantes marcações de pluripotencialidade e de auto-renovação das células-tronco embrionárias (ESCs), uma vez que a utilização de bFGF (basic Fibroblastic Growth Factor) em células-tronco mesenquimais (MSCs) causou a expressão de Sox2, demonstrando também que as células possuem proliferação consistente e capacidade osteogênica. No entanto, a expressão do Nanog, mesmo sem a utilização do bFGF, foi mantida, indicando que as células possuíam

proliferação alta e capacidade osteogênica. Uma vez que as células utilizadas no presente estudo são derivadas de tecido ósseo fetal canino, as marcações para Sox2 e Nanog foram positivas, sugerindo então que as células têm capacidade osteogênica e alta proliferação. No entanto, segundo descrições de Pierantozzi et al. (2011) não ocorre marcação de Oct4 e Sox2 em MSCs, mas ocorre a marcação para Nanog.

A expressão positiva para VEGF foi observada nesta linhagem celular, a ação do VEGF no tecido ósseo é essencial, na promoção de angiogênese, que fornece nutrientes para crescimento, renovação e regeneração óssea. Ohtsubo, Matsuda e Takekawa (2003) demonstraram a importância da angiogênese no osso, comparando a realização de um transplante autólogo de osso parietal com um material sintético de hidroxiapatita, que evidenciando marcação negativa do VEGF na fase inicial do transplante com material sintético, e positiva no transplante autólogo, sugerindo que o VEGF foi interrompido no material sintético enquanto no transplante autólogo a angiogênese continuou normalmente e o resultado foi satisfatório. Mesmo interrompendo a angiogênese no material sintético, cresceram vasos imaturos, demonstrando que o material sintético de hidroxiapatita não era tão resistente quanto o enxerto autólogo. Clarkin e Gerstenfeld (2013) descreveram os efeitos do VEGF durante o desenvolvimento e crescimento ósseo, os quais apresentaram amplo repertório. Seus receptores foram demonstrados pelas células ósseas, indicando que o VEGF e seus receptores desempenham papel vital para a junção dos processos de osteogênese e angiogênese no osso adulto, durante as fases de remodelamento e de reparação óssea. A marcação e expressão de VEGF nas células oriundas de osso fetal canino foram positivas, sugerindo que a angiogênese estava presente nessas células, processo ao qual a osteogênese está relacionada, sugerindo assim serem células ideais para aplicação prática.

O PCNA atua de modo direto na proliferação celular, uma vez que está envolvido nos processos de manutenção, duplicação e transmissão de genoma, facilitando assim a interação entre proteínas e proteína-DNA no ramo da replicação (Indiani e O'Donnel, 2006; Maldovan et al., 2007; Mailand et al., 2013). Sendo assim, nos resultados apresentados nesse estudo, células-tronco mesenquimais derivadas de tecido ósseo fetal canino foram positivas para PCNA, comprovando com os dados do teste de viabilidade e proliferação celular.

Segundo Gronthos et al. (2003), o colágeno I está relacionado com a capacidade clonogênica das células mesenquimais derivadas de medula óssea. Para isso, foi feita seleção purificada das células-tronco mesenquimais oriundas de medula óssea, apresentando expressão maior que 90%. No presente estudo, a marcação para colágeno tipo I foi positiva, sugerindo que as células em passagem 4 ainda possuíam capacidade clonogênica.

Para os marcadores mesenquimais CD90 e CD105 a marcação foi positiva, enquanto que para os marcadores hematopoéticos CD34, CD45 e CD117 a marcação foi negativa, dados acerca da caracterização de células mesenquimais que corroboram com o presente estudo em marcações positivas para CD90 e CD105; e negativas para CD34 e CD45 que foram encontrados por Karaoz et al., (2009), Cheng et al., (2012), Favaron et al., (2014) e Lotfy et al., (2014). Os critérios para caracterização de células mesenquimais de acordo com o Comitê de Células-tronco Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular são marcações positivas para CD90 e CD105; marcações negativas para CD34 e CD45; e as células mesenquimais devem diferenciar-se em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (DOMINICI et al., 2006).

A diferenciação das células em linhagem adipogênica, osteogênica e condrogênica é um dos critérios de uma célula mesenquimal segundo Domini et al (2006), também proposto pelo Comitê de Células-tronco Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular, corroborando com achados em Cheng et al. (2012), que demonstraram que as células mesenquimais derivadas de epífise se diferenciaram nessas linhagens. Além disso, realizamos o teste de potencial tumorigênico das células provenientes de tecido ósseo fetal canino. Durante um período de 6 semanas nenhuma formação tumoral foi observada, resultado demonstrado em de Wenceslau et al. (2011) e Favaron et al. (2014). Baseado nesses achados, os resultados sugerem que as células OSTBN6 não promovem formação tumoral quando aplicadas *in vivo*. Sendo assim, as células constituem fonte segura para utilização na medicina regenerativa, uma vez que a célula mesenquimal é uma fonte para terapia celular, no que se refere a tecidos com traumas ou fratura, no caso do osso e/ou cartilagem.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

- A metodologia utilizada no estabelecimento da cultura primária de células provenientes de tecido ósseo fetal canino, utilizando meio de cultivo DMEM-High Glucose e Alpha-MEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácido e 1% de estreptomicina/penicilina foi eficiente para a obtenção e expansão para a linhagem celular OSTBN6;
- A linhagem celular OSTBN6 apresentou duas morfologias distintas, uma fibroblastóide e outra triangular;
- A partir do teste de viabilidade e proliferação celular, as células OSTBN6 mostraram-se viáveis e com ótima capacidade proliferativa;
- A expressão de marcadores das células OSTBN6 demonstrou características mesenquimais, com certo potencial de pluripotência;
- Quando submetidas ao ensaio de diferenciação, as células OSTBN6 mostraram capacidade de se diferenciar em três linhagens mesenquimais: adipogênica, osteogênica e condrogênica;
- As células OSTBN6 não demonstraram potencial tumorigênico quando inoculadas em camundongos NUDE, constituindo assim excelente fonte de células-tronco para terapia celular.

Referências
Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: From Basic biology to clinical applications. **Gene Ther**, v. 15, p. 109–116, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/gt/journal/v15/n2/full/3303067a.html>>. Acesso em: 2 jul. 2015

AUBIN, J. E. Bone stem cells. **J Cell Biochem Suppl**, v. 30-31, p. 73–82, 1998. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-4644](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-4644)>. Acesso em: 2 jul. 2015

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.

BARRY, F.; BOYNTON, R. E.; LIU, B.; MURPHY, J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Exp Cell Res**, v. 268, p. 189–200, 2001. Disponível em: <[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014-4827\(01\)95278-4](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014-4827(01)95278-4)>. Acesso em: 2 jul. 2015

BIASIBETTI, A.; ALOJ, D.; DI GREGORIO, G.; MASSE, A.; SALOMONE, C. Mechanical and biological treatment of long bone non-unions. **Injury**, v. 36 Suppl 4, p. S45–50, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00201383/36/4/supp/S>>. Acesso em: 2 jul. 2015

BILEZIKIAN, J. B. **Principles of bone biology**. [s.l.] Elsevier, 2002.
BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; MARTIN, J. **Principles of bone biology**. 3rd. ed. Amsterdam: ELSEVIER, 2008.

BINDERMAN, I.; DUKSIN, D.; HARELL, A.; KATZIR (KATCHALSKI), E.; SACHS, L. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. **The Journal of cell biology**, v. 61, n. 2, p. 427–439, 1974. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/61/2/427.long>>. Acesso em: 2 jul. 2015

BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G. L.; MCHUGH, P. E.; SHAW, G.; BARRY, F. P.; MCNAMARA, L. M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **Eur Cell Mater**, v. 23, p. 13–27, 2012. Disponível em: <<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol023/vol023a02.php>>. Acesso em: 2 jul. 2015

CAPRA, P.; CONTI, B. Articles the role of bone morphogenetic proteins (BMPs) in bone tissue engineering : a mini review. **Scientifica Acta**, v. 3, n. 1, p. 25–32, 2009. Disponível em: <<http://siba.unipv.it/fisica/ScientificaActa/SA.htm>>. Acesso em: 2 jul. 2015

CHENG, C.-C.; LIAN, W.-S.; HSIAO, F. S.-H.; LIU, I.-H.; LIN, S.-P.; LEE, Y.-H.; CHANG, C.-C.; XIAO, G.-Y.; HUANG, H.-Y.; CHENG, C.-F.; CHENG, W. T.-K.; WU, S.-C. Isolation and characterization of novel murine epiphysis derived mesenchymal stem cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36085, jan. 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036085>>. Acesso em: 13 jan. 2015.

CLARKIN, C. E.; GERSTENFELD, L. C. VEGF and bone cell signalling: An essential vessel for communication? **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2013.

Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.2911/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10:00-16:00+BST+/-+05:00-11:00+EDT+/-+17:00-23:00+SGT+for+essential+maintenance.++Apologies+for+the+inconve>>. Acesso em: 2 jul. 2015

CLINES, G. A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis.

Current opinion in organ transplantation, v. 15, n. 1, p. 73–78, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127284/>>. Acesso em: 2 jul. 2015

DE BIASE, P.; CAPANNA, R. Clinical applications of bmps. **Injury**, v. 36 Suppl 3, p. S43–6, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16188549>>. Acesso em: 2 jul. 2015

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**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324906708817>>. Acesso em: 2 jul. 2015

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5484, p. 1501–4, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/289/5484/1501>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Text of veterinary anatomy**. Fourth Edition. Saint Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2010.

FAVARON, P. O.; MESS, A.; WILL, S. E.; MAIORKA, P. C.; DE OLIVEIRA, M. F.; MIGLINO, M. A. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from new world mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e95575, 2014.

Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095575>>. Acesso em: 2 jul. 2015

GRECO, S. J.; LIU, K.; RAMESHWAR, P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. **Stem cells**, v. 25, n. 12, p. 3143–3154, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2007-0351/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10:00-16:00+BST+/-+05:00-11:00+EDT+/-+17:00-23:00+SGT+for+essential+maintenance.++Apologies+for+>>. Acesso em: 2 jul. 2015

HEINEMANN, C.; HEINEMANN, S.; WORCH, H.; HANKE, T. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. **European Cells and Materials**, v. 21, p. 80–93, 2011.

Disponível em: <<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol021/pdf/v021a07.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2015

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. 1st. ed. Rio de Janeiro, Brazil: Elsevier, 2012.

IZADPANA, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. a. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1285–1297, 2006.

Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.20904/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10:00-16:00+BST+/-+05:00-11:00+EDT+/-+17:00-23:00+SGT+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+incon>>.

Acesso em: 2 jul. 2015

JAYAKUMAR, P.; DI SILVIO, L. Osteoblasts in bone tissue engineering. **Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 12, p. 1415–1440, 2010a. Disponível em:

<<http://pih.sagepub.com/content/224/12/1415>>. Acesso em: 2 jul. 2015

JAYAKUMAR, P.; DI SILVIO, L. Osteoblasts in bone tissue engineering. **Proc Inst Mech Eng H**, v. 224, p. 1415–1440, 2010b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287829>>. Acesso em: 2 jul. 2015

KANCZLER, J. M.; OREFFO, R. O. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 100–114, 2008. Disponível em:

<<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol015/pdf/v015a08.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2015

KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S.; SARIBOYACI, A. E.; KAYMAZ, F.; KASAP, M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 5, p. 533–546, 2009. Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1007/s00418-009-0629-6>>. Acesso em: 2 jul. 2015

KARTSOGIANNIS, V.; NG, K. W. Cell Lines and Primary Cell Cultures in the Study of Bone Cell Biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 228, n. 1-2, p. 79–102, 2004.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720704002588>>.

Acesso em: 2 jul. 2015

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. **Histologia e biologia celular : uma introdução à patologia**. 3a Edição ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2012.

KIMELMAN, N.; PELLER, G.; GAZIT, Z.; GAZIT, D. Applications of Gene Therapy and Adult Stem Cells in bone bioengineering. **Regenerative medicine**, v. 1, n. 4, p. 549–561, 2006. Disponível em:

<<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/17460751.1.4.549>>.

Acesso em: 2 jul. 2015

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of tissue engineering**. 3rd Edition ed. [s.l.] Academic Press, 2007.

LEVY, J.; SHIMSHONI, Z.; SOMJEN, D.; BERGER, E.; FINE, F.; SILBERMANN, M.; BINDERMAN, I. Rat epiphyseal cells in culture: responsiveness to bone-seeking hormones.

In Vitro Cellular & Developmental Biology, v. 24, n. 7, p. 620–624, 1988. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02623598>>. Acesso em: 2 jul. 2015

LI, M.; ZHAO, L.; LIU, J.; LIU, A. L.; ZENG, W. Sen; LUO, S. Q.; BAI, X. C. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. **Anatomical Record**, v. 292, n. 8, p. 1107–1113, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.20925/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10%3A00-16%3A00+BST+%2F+05%3A00-11%3A00+EDT+%2F+17%3A00-23%3A00+SGT+for+essential+maintenance.+Apologies>>. Acesso em: 2 jul. 2015

LOTIFY, A.; SALAMA, M.; ZAHRAN, F.; JONES, E.; BADAWEY, A.; SOBH, M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue : a comparative study. **International Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 135–142, 2014. Disponível em: <<http://www.ijstemcell.com/>>. Acesso em: 2 jul. 2015

MAROLT, D.; KNEZEVIC, M.; NOVAKOVIC, G. V. Bone tissue engineering with human stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 2, p. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.stemcellres.com/content/1/2/10>>. Acesso em: 2 jul. 2015

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>>. Acesso em 2 jul. 2015

NIWA, H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. **Cell structure and function**, v. 26, n. 3, p. 137–148, 2001. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/26/3/26_3_137/_article>. Acesso em: 2 jul. 2015

OHNISHI, H.; YUBA, S.; OHGUSHI, H. Forced expression of transcription factors in human mesenchymal cells to promote proliferation and osteogenic differentiation. **Bioceramics Development and Applications**, v. 1, p. 1–4, 2011. Disponível em: <<http://www.omicsonline.com/open-access/forced-expression-of-transcription-factors-in-human-mesenchymal-cells-to-promote-proliferation-and-osteogenic-differentiation-2090-5025.110166.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2015

OHTSUBO, S.; MATSUDA, M.; TAKEKAWA, M. Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone. **Histology and Histopathology**, v. 18, n. 1, p. 153–163, 2003. Disponível em: <http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_18/18_1/18_1_153.htm>. Acesso em: 2 jul. 2015

PAPATHANASOPOULOS, A.; GIANNOUDIS, P. V. Biological Considerations of Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. **Injury**, v. 39, n. Suppl 2, p. S21–32, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020138308700123>>. Acesso 2 jul. 2015

PESCE, M.; GROSS, M. K.; SCHÖLER, H. R. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 20, n. 9, p. 722–732, 1998. Disponível em:

<[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199809\)20:9%3C722::AID-BIES5%3E3.0.CO;2-I/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10%3A00-16%3A00+BST+%2F+05%3A00-11%3A00+EDT+%2F+17%3A00->](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1521-1878(199809)20:9%3C722::AID-BIES5%3E3.0.CO;2-I/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10%3A00-16%3A00+BST+%2F+05%3A00-11%3A00+EDT+%2F+17%3A00->). Acesso em: 2 jul. 2015

PESCE, M.; WANG, X.; WOLGEMUTH, D. J.; SCHÖLER, H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. **Mechanisms of development**, v. 71, n. 1-2, p. 89–98, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477398000021>>. Acesso em: 2 jul. 2015

PIERANTOZZI, E.; GAVA, B.; MANINI, I.; ROVIELLO, F.; MAROTTA, G.; CHIAVARELLI, M.; SORRENTINO, V. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. **Stem cells and development**, v. 20, n. 5, p. 915–923, 2011. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2010.0353>>. Acesso em: 2 jul. 2015

PORTER, J. R.; RUCKH, T. T.; POPAT, K. C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539–1560, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.246/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+have+intermittent+access+on+8th+August+2015+from+10%3A00-16%3A00+BST+%2F+05%3A00-11%3A00+EDT+%2F+17%3A00-23%3A00+SGT+for+essential+maintenance.++Apologies>>. Acesso em: 2 jul. 2015

REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. 12^a edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006.

RODDA, S. J.; MCMAHON, A. P. Distinct roles for hedgehog and canonical wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. **Development**, v. 133, n. 16, p. 3231–3244, 2006. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/content/133/16/3231>>. Acesso em: 2 jul. 2015

RODRIGUEZ-ESTEBAN, C.; TSUKUI, T.; YONEI, S.; MAGALLON, J.; TAMURA, K.; IZPISUA BELMONTE, J. C. The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. **Nature**, v. 398, n. 6730, p. 814–818, 1999. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v398/n6730/full/398814a0.html>>. Acesso em: 2 jul. 2015

RUPANI, A.; BALINT, R.; CARTMELL, S. H. Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering | CHC. **Cell Health and Cytoskeleton**, v. 4, p. 49–61, 2010. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/osteoblasts-and-their-applications-in-bone-tissue-engineering-peer-reviewed-article-CHC>>. Acesso em: 2 jul. 2015

SCHMID, J.; WALLKAMM, B.; HAMMERLE, C. H.; GOGOLEWSKI, S.; LANG, N. P. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. a case report of a rabbit experiment. **Clin Oral Implants Res**, v. 8, p. 244–248, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586469>>. Acesso em: 2 jul. 2015

SUNG, J. H.; YANG, H. M.; PARK, J. B.; CHOI, G. S.; JOH, J. W.; KWON, C. H.; CHUN, J. M.; LEE, S. K.; KIM, S. J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 8, p. 2649–2654, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134508010592>>. Acesso em: 2 jul. 2015

TANG, Y.; WU, X.; LEI, W.; PANG, L.; WAN, C.; SHI, Z.; ZHAO, L.; NAGY, T. R.; PENG, X.; HU, J.; FENG, X.; VAN HUL, W.; WAN, M.; CAO, X. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. **Nature medicine**, v. 15, n. 7, p. 757–765, 2009a. Disponível em: <<http://www.nature.com/nm/journal/v15/n7/full/nm.1979.html>>. Acesso em: 2 jul. 2015

TORREGGIANI, E.; MATTHEWS, B. G.; PEJDA, S.; MATIC, I.; HOROWITZ, M. C.; GRCEVIC, D.; KALAJZIC, I. Preosteocytes/osteocytes have the potential to dedifferentiate becoming a source of osteoblasts. **Plos One** v. 8 n. 9, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0075204>>. Acesso em: 2 jul. 2015

TRUETA, J. The role of the vessels in osteogenesis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, p. 402–418, 1963. Disponível em: <<http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/45-B/2/402>>. Acesso em: 2 jul. 2015

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue engineering. Part A**, v. 17, n. 17-18, p. 2165–2176, 2011. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2010.0678>>. Acesso em: 2 jul. 2015

YANG, X.; KARSENTY, G. Transcription Factors in Bone: Developmental and Pathological Aspects. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 340–345, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491402023407>>. Acesso em: 2 jul. 2015

YOUNG, B.; WOODFORD, P.; O'DOWD, G. **Wheater's functional histology: a text and colour atlas**. 6th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2013.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006.

ZAIDI, M. Skeletal Remodeling in Health and Disease. **Nature medicine Med**, v. 13, n. 7, p. 791–801, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/nm/journal/v13/n7/full/nm1593.html>>. Acesso em: 2 jul. 2015

APÊNDICE A

Quadro 1 - Informações sobre os anticorpos utilizados para a imunofluorescência e citometria de fluxo

ANTICORPO	REATIVIDADE	FABRICANTE
Oct 4 (ab19857)	Camundongo, Ovelha, Humano, macaco Rheses	ABCAM
Nanog (sc30331)	Humano	Santa Cruz Biotechnology
Sox2 (sc17320)	Humano, camundongo	Santa Cruz Biotechnology
PCNA (sc56)	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology
VEGF (ab1316)	Humano, camundongo, rato, Coelho e Cão	ABCAM
CD34 (55751)	Humano	BD Bioscience
CD45 FITC (MHCD4501)	Humano	Invitrogen
CD90	Mouse	
CD105 (ab53321)	Human, Pig	ABCAM
CD117 (A4502)	Humano	Dako
COL1A1 (sc25974)	Camundongo, Cão, Equino, Ave e Bovino	Santa Cruz Biotechnology
Cell Trace Violet Cell Proliferation kit (C34557)	Não se aplica	Invitrogen

Fonte: (OLIO, R. L., 2015)

APÊNDICE B

Quadro 2 - Informações sobre os primers utilizados para o qRT-PCR

Gene	Sequência dos Primers
GAPDH	F: AGT ATG ATT CTA CCC ACG GCA AA
	R: CAC AAC ATA CTC AGC ACC AGC AT
OCT4	F: TCG TGA AGC CGG ACA AGG AGA AG
	R: AGG AAC ATG TTC TCC AGG TTG CCT
VEGF	F: TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT
	R: TGT GCT CTC CTC CTG CCA TAG
Osteopontina	F: TAT GGA AGA TGA CTT CAA TGC CG
	R: GGC CCT TGG TTT CCA TAC TG
Osteocalcina	F: CTG GTG TTT CCA CTG ACA C
	R: CAG GGC TAT TTG GGA GTC AT
RUNX-2	F: CCA TAA CCG TCT TCA CAA ATC C
	R: AAT GCG CCC TAA ATC ACT G
COL 1A1	F: GTA GAC ACC ACC CTC AAG AGC
	R: CCA GTC GGA GTG GCA CAT

Fonte: (OLIO, R. L., 2015)