Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Análise das características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes obtidas de diferentes regiões anatômicas de pacientes com Pseudoartrose Congênita da Tíbia.

JENNY MANZANO ROMERO

Ribeirão Preto 2018

JENNY MANZANO ROMERO

Análise das características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes obtidas de diferentes regiões anatômicas de pacientes com Pseudoartrose Congênita da Tíbia.

Versão original

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto 2018 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Manzano, Jenny Romero

Análise das características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes obtidas de diferentes regiões anatômicas de pacientes com pseudoartrose congênita da tíbia. Ribeirão Preto, 2018.

53 p. il. 30 cm

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu covas.

1. Células estromais mesenquimais multipotentes. 2. Pseudoartrose Congênita da Tíbia. 3. Hamartoma fibroso. 4. Tecido ósseo 5. Diferenciação osteogênica.

Folha de aprovação

Jenny Manzano Romero

Análise das características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes obtidas de diferentes regiões anatômicas de pacientes com pseudoartrose congênita da Tíbia.

Tese de Mestrado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo do título de Doutor em Ciências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Células-tronco e terapia celular.

Aprovado em:

Banca examinadora					
Prof. Dr					
nstituição:					
ulgamento:					
Prof. Dr					
nstituição					
ulgamento:					
Prof. Dr					
nstituição:					
ulgamento:					

Agradecimentos

A meu orientador Prof.Dr. Dimas Tadeu Covas, agradeço por ter aberto as portas da Fundacao Hemocentro de Ribeirao Peto, pela oportunidade de me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança e preciosa ajuda para com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Oncologia Clinica, Células-Tronco e Terapia Celular, por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e pela contribuição para com a minha formação professional.

A Maristela Delgado Orella, por todo carinho, presteza e confianza construídos nestes dois anos e principalmente por me apoiar em tudo.

Ao laboratório de Terapia Celular: Sâmia e Taísa, por todo ensinamento e por contribuir tanto com todos os assuntos relacionados às CMMs.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

Agradeço a Dra. Andrea Magalhaes, pela dedicação e ajuda imensurável desde o início desta pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização desta pesquisa, muito obrigada!

RESUMO

MANZANO, J. Análise das características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes obtidas de diferentes regiões anatômicas de pacientes com Pseudoartrose Congênita da Tíbia. 2018. 62 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A Pseudoartrose Congênita da Tíbia (PCT) é uma das doenças mais desafiantes da ortopedia pediátrica pela dificuldade em obter a união óssea e, quando esta ocorre, em mantê-la. É uma doenca muito rara, difícil de tratar devido à sua falta de conhecimento sobre a patogênese. As Células estromais mesenguimais multipotentes (CMM) podem desempenhar um papel na patogênese do PCT, possivelmente devido à falha da diferenciação osteogênica. O estudo das CMM pode ajudar a compreender a patogênese da doença e desenvolver novas estratégias terapêuticas baseados no uso desta célula no futuro próximo. Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivo a análise das características biológicas das CMM isoladas de diferentes regiões anatômicas de medula óssea de pacientes com PCT. Para isto, amostras de medula óssea foram coletas a partir de locais afetados e não afetadas pela doença: Crista ilíaca do membro não afetada (CINA), crista ilíaca do membro afetada (CIA), tíbia não afetada (TNA), e tíbia afetada (TA). O numero de pacientes incluídos no estudo foi três: PCT1, PCT2 e PCT3. Os resultados mostraram que todas as células isoladas de pacientes com PCT apresentavam características compatíveis com as CMM. A taxa de formação de unidades formadoras de colônias das células da TA tanto no PCT2 quanto no PCT3 foi significativamente menor em relação às células da TNA e CINA respectivamente (p<0.05). A quantidade de células positivas para o marcador CD146 foi menor nas células da TA do PCT1 e PCT2, A análise estatística mostrou que não há uma diferença significativa. Este marcador esta relacionado com a capacidade multipotente e formação óssea in vivo. No PCT1 observou-se que formação de matriz mineralizada das CMM isoladas da CIA foi significativamente maior em relação a TA. Além disso, as células da TA do PCT1 observou-se um uma secreção significativa de alguns citocinas envolvidas no processo de formação óssea, como CCL2, CCL3, CCL4, TNA-alfa, PDGF-BB, e GM-CSF. A alteração destas citocinas pode levar a situações complicadas como o caso de não consolidação óssea. Com os resultados obtidos, se há demonstrado que as CMM da tíbia afetada tenta formar osso, mas no local da lesão é insuficiente, por tal motivo é preciso realizar estudos focados no mecanismo molecular.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais multipotentes, Pseudoartrose Congênita da Tíbia, hamartoma fibroso, tecido ósseo, diferenciação osteogênica.

ABSTRACT

MANZANO, J. Analysis of the biologic characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells obtained from different anatomic regions of patients with Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia. 2018. 53 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Congenital pseudoarthrosis of the tibia (CPT) is one of the most challenging orthopedic diseases because of the difficulty in obtaining bone union and, when it happens, in maintaining it. It is a rare disease, difficult-to-treat due to the lack of knowledge about to pathogenesis. Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) may play a role in the pathogenesis of PCT, possibly due to a failure in the osteogenic differentiation. Studying these cells can help to better understand the pathogenesis of the disease and develop new therapeutic strategies based on the use of MSC in the near future. In view of the above, this work had the objective of analyzing the biological characteristics of CMM isolated from different anatomic regions of bone marrow of patients with PCT. For this, bone marrow samples were collected from sites affected and unaffected by the disease: unaffected limb iliac crest (CINA), affected limb iliac crest (CIA), unaffected tibia (TNA), and affected tibia (TA). The number of patients included in the study was three: PCT1, PCT2 and PCT3. The results showed that all cells isolated from PCT patients had characteristics compatible with CMM. The rate of formation of colonyforming units of TA cells in both PCT2 and PCT3 was significantly lower in TNA and CINA cells respectively (p < 0.05). The amount of cells positive for the CD146 marker was lower in the TA cells of PCT1 and PCT2. Statistical analysis showed no significant difference. This marker is related to the multipotent capacity and bone formation in vivo. In PCT1 it was observed that the formation of mineralized matrix of CMCs isolated from CIA was significantly higher in relation to AT. In addition, PCT1 TA cells showed a significant secretion of some cytokines involved in the bone formation process, such as CCL2, CCL3, CCL4, TNA-alpha, PDGF-BB, and GM-CSF. The alteration of these cytokines can lead to complicated situations such as the case of non-consolidation of bone. With the results obtained, if the CMM of the affected tibia has been shown to try to form bone, but at the site of the lesion is insufficient, it is necessary to carry out studies focused on the molecular mechanism.

Key words: Multipotent mesenchymal stromal cells, Congenital pseudoarthrosis of the tibia, fibrous hamartoma, bone tissue, osteogenic differentiation

Lista de ilustrações

Figura 5 - Diferenciação osteogênica *in vitro* das CMM isoladas de diferentes locais da medula ossea dos três pacientes com PCT. Fotografias realizadas com aumento de 100x. os deposito de calcio são evidenciados pela coloração *Alizarin Red......*54

Figura 9 - Análise das proteínas secretadas pelas CMM obtidas do PCT1. Os asteriscos indicam resultados com diferenças significativas (*) p<0.05 (n=3)......77

Lista de tabelas

Tabela 1 - Relação de sondas TaqMan [™] (Life Technologies) utilizadas para análiseexpressão genica por PCR em tempo real	da .30
Tabela 2 - Informações clínicas dos pacientes incluidos no estudo	. 40
Tabela 3 - Imunofenotipagem das CMM obtidas dos pacientes com PCT	.63

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	Células estromais mesenquimais multipotentes (CMM)	12
1.2	CMM e Tecido ósseo	14
1.3	Pseudoartrose Congênita da Tíbia e Tecido ósseo (PCT)	18
1.3.	1 Difinição	18
1.3.2	2 Manifestação clínica	19
1.3.3	3 Etiologia	19
1.3.3	3 Patologia	20
1.3.4	4 Classificação	21
1.3.5	5 Tratamento	22
1.4	Peudoartrose congênita da tíbia e CMM	23
2 H	HIPÓTESE	25
3 (DBJETIVOS	25
3.2	Objetivo geral	25
3.3	Objetivos específicos	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.12	Análise do potencial proliferativo	32
4.13	Análises das proteínas secretadas pelas CMM	32
4.14	Análises do potencial da diferenciação osteogênica	34
4.14	.1 Determinação da atividade de fosfatase alcalina	34
4.14	.2 Análise da formação da matriz mineralizada	34
4.14	.3 Análise da expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteogênica	35
4.14	.3.1 Extração do RNA total	35
4.14	.3.2 Reação de Transcrição Reversa	36
4.14	.3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	36
4.15	Análises do potencial da diferenciação em adipócitos	37
4.13	Análises estatísticas	38

5.	RESULTADOS	39
5.1	Caracterização dos pacientes	39
5.2	Quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastóides	39
5.3	Característica Morfológica das CMM de pacientes com PCT	40
5.4	Imunofenotipagem das CMM	41
5.5	Capacidade de diferenciação celular em linhagens mesodérmicas	42
5.6	Formaco de matriz mineralizada	45
4.1	Análise das proteínas secretadas pelas CMM	46
4.	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes (CMM)

As células estromais mesenquimais multipotentes, também conhecidas como células-tronco mesenquimais foram descritas pela primeira vez por Fridenstein et al (1976), como células clonais com capacidade de adesão à superfície plástica e com uma morfologia semelhante a fibroblastos. Estas células constituem uma população heterogênea, com células em diferentes estágios de diferenciação e com apenas uma pequena porcentagem de células com capacidade de autorrenovação e diferenciação in vivo (MURAGLIA; CANCEDDA; QUARTO, 2000).

No ser humano a principal fonte de isolamento de CMM é a medula óssea. No entanto, essas células constituem somente uma pequena porcentagem (0,001% a 0,01%) das células nucleadas presentes na medula óssea (PITTENGER et al., 1999). A quantidade de CMM diminui com a idade e enfermidade. Assim, a maior quantidade de CMM é encontrada em recémnascidos e na idade de 80 anos, esta quantidade é reduzida aproximadamente na metade (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2010).

Além da medula óssea, as CMM já foram isoladas em diversos outros tecidos, como o tecido adiposo (ZUK et al., 2001), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), endotélio da veia umbilical (COVAS et al., 2003), da veia safena (COVAS et al., 2005), sangue de cordão umbilical (Zhang et al., 2004), geleia de Wharton (WANG et al., 2004), tecido do cordão umbilical (VAN PHAM et al., 2016), fluido amniótico (TSAI et al., 2004), fígado fetal (CAMPAGNOLI et al., 2001) e com uma frequência extremamente menor no sangue periférico (ZVAIFLER et al., 2000).

As CMM derivadas da medula óssea também são conhecidas como células-tronco esqueléticas ou células estromais da medula óssea. Essas células estão presentes no estroma da medula óssea, são capazes de se diferenciarem em várias linhagens de células do tipo mesodérmico, incluindo osteócito, condrócito, adipócito, tenócito, mioblasto, fibroblasto e cardiomiócito (PITTENGER et al., 1999; JIANG et al., 2002; ABDALLAH; KASSEM, 2008;

BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2010); e em células não mesodérmicas como hepatócitos e neurônios (EGUSA et al., 2005; AL GHRBAWY et al., 2016).

Dentre as principais funções das CMM da medula óssea estão a manutenção do microambiente estromal da medula e a participação na regulação da hematopoese (BYDLOWSKI et al., 2009).

As CMM possuem também habilidade de secretar numerosas moléculas com propriedades anti-apoptóticas, angiogênicas, anti-fibróticas, quimiotácticas, e imunomodulatórias, bem como fatores que influenciam na proliferação e diferenciação de células progenitoras (MEIRELLES D.S. et al., 2009; SINGER; CAPLAN, 2011).

Além disso, estas células possuem habilidade quimiotática e de migração para áreas de lesão ou inflamação, isto é devido à expressão de receptores para fatores de crescimento, matriz extracelular e citocinas em sua membrana. No local da lesão, as CMM são capazes de se diferenciarem na linhagem mesodérmica necessária para reparar o dano tecidual ou liberar fatores que estimulam a regeneração do tecido (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009; FAYAZ et al., 2011; LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016).

As CMM podem ser expandidas em cultura e dar origem às unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F) que, por sua vez, possuem alto potencial proliferativo in vitro. Diversos protocolos têm sido desenvolvidos com o objetivo de isolar e expandir estas células. O método de isolamento tradicional baseia-se no fato destas células aderirem seletivamente em superfícies plásticas, enquanto as células hematopoéticas são removidas com as trocas do meio de cultura. Até o momento, não há um marcador específico que identifiquem estas células (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2010).

Considerando o seu o seu fácil isolamento e cultivo, capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares e produção de numerosos fatores de crescimento e citocinas, as CMM tem se tornado candidatas ideais no campo da medicina regenerativa (ARVIDSON et al., 2011).

Em virtude do aumento significativo no interesse clínico e biológico das

CMM nas ultima décadas, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, do inglês Internacional Society of Cell Therapy) estabeleceu três critérios básicos para definir e caracterizar as CMM, independentemente da fonte de isolamento: primeiro, as células devem ser aderentes ao plástico; segundo, devem apresentar alta porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e baixa porcentagem ou ausência para os marcadores hematopoiéticos CD45, CD19 ou CD79, CD14 ou CD11b, e HLA-DR; e o terceiro, devem ser capazes de se diferenciar in vitro em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI et al., 2006).

Dependendo das condições de cultivo, as CMM da medula óssea podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (ARVIDSON et al., 2011; GIULIANI et al., 2013). Sendo a diferenciação em osteoblastos a mais estudada.

A diferenciação osteogênica de CMM da medula óssea é regulada por fatores locais e sistêmicos. Dentre os fatores sistêmicos temos os hormônios, tais como hormônios da paratireoide, estrógenos e glicocorticoides. Os fatores locais incluem fatores de crescimento e citocinas. Estes fatores ativam vias de sinalização específicas que modificam a expressão e atividade de vários genes que participam nesta diferenciação (DIRCKX; HUL; MAES, 2013; GIULIANI et al., 2013).

A diferenciação das CMM em osteoblastos apresenta quatro estágios: CMM, células osteoprogenitoras, pre-osteoblastos e osteoblastos (NAKASHIMA; DE CROMBRUGGHE, 2003).

Nos últimos anos, o uso de CMM da medula óssea vem ganhando grande interesse na reparação e regeneração do osso tanto na terapia celular quanto na engenharia de tecidos. Isso se deve à diferenciação das CMM em osteoblastos funcionais, e a sua capacidade de produzir fatores de crescimento e citocinas envolvidas na formação do tecido ósseo. (ARVIDSON et al., 2011).

1.2 CMM e Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado, caracterizado pela sua rigidez, dureza e poder de regeneração e reparação (KINI; NANDEESH, 2012). Este tecido está sendo constantemente remodelado ao longo da vida para manter a integridade esquelética e a resistência mecânica. As CMM da medula óssea contribuem para os processos normais de remodelação e reparação, proporcionando um conjunto de osteoblastos necessários para formar a matriz mineralizada do tecido ósseo (AGNIESZKA; ZANNETTINO; GRONTHOS, 2009; KINI; NANDEESH, 2012; KATSIMBRI, 2017).

O tecido ósseo é responsável pelas funções de locomoção, suporte e proteção de órgãos vitais (encéfalo, medula espinhal, coração e pulmão), além de suporte da hematopoese, reserva de minerais, especialmente de cálcio, apoio para músculos, ligamentos, e tendões. (ARVIDSON et al., 2011).

Do ponto de vista anatômico o tecido ósseo pode ser classificado em compacto e esponjoso. O tecido ósseo compacto ou cortical apresenta funções mecânicas e de proteção, devido a sua constituição dura e compacta. O tecido ósseo esponjoso ou trabecular apresenta funções metabólicas. A estrutura deste osso possui um aspecto poroso, devido ao fato de estar organizando em trabéculas irregulares dispostas em vários sentidos, deixando espaços livres entre si (KINI; NANDEESH, 2012).

O osso cortical possui uma superfície periosteal externa e superfície endosteal interna. O periósteo é uma camada de tecido conjuntivo fibroso que envolve a superfície cortical externa do osso, contém vasos sanguíneos, fibras nervosas, CMM indiferenciadas, células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos. Suas principais funções são proteger, nutrir e ajudar na formação óssea. O periósteo desempenha um papel importante no crescimento aposicional e no reparo de fraturas (CLARKE, 2008; KINI; NANDEESH, 2012; LI et al., 2017). O endósteo é uma estrutura membranosa que cobre a superfície interna do osso cortical e esponjoso e os canais dos vasos sanguíneos presentes no osso. Contêm vasos sanguíneos, osteoblastos e osteoclastos (CLARKE, 2008).

15

O tecido ósseo é constituído por células e uma matriz óssea. A matriz óssea contém moléculas orgânicas (35%) e inorgânicas (65%). A matriz orgânica é composta predominantemente por colágeno tipo I (90%) com pequenas quantidades de proteínas não-colágenas (glicoproteínas, proteolipídeos e fosfoproteinas). O cálcio e fosfato são moléculas inorgânicas que formam cristais de hidroxiapatita que mineraliza a matriz orgânica (ARVIDSON et al., 2011; HLAING; COMPSTON, 2014). As principais células presentes no osso incluem: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são células derivados de CMM e são responsáveis pela formação óssea e pela mineralização de matriz óssea. Os osteócitos são células originárias de osteoblastos terminalmente diferenciados, localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz e são responsáveis pela manutenção da massa e da estrutura óssea. Os osteoclastos são células grandes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção da matriz óssea (NAKASHIMA; DE CROMBRUGGHE, 2003; ARVIDSON et al., 2011; KATSIMBRI, 2017).

As CMM desempenham um papel fundamental na formação do tecido ósseo, devido a sua proliferação, diferenciação, produção de matriz extracelular e consequentemente sua calcificação (AGNIESZKA; ZANNETTINO; GRONTHOS, 2009).

A formação do tecido ósseo ocorre através de dois mecanismos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa ocorre na maioria dos ossos do crânio, tais como frontal, parietal, partes do occipital e temporal e das maxilas superior e inferior. Além disso, contribui para o crescimento dos ossos curtos e o crescimento em espessura dos ossos longos. Este processo envolve a formação direta de osso sem a formação de inicialmente. As células osteoprogenitoras comprometidas e CMM indiferenciadas do periósteo se diferenciam em osteoblastos, e estes por sua vez, sintetizam matriz óssea que consequentemente é mineralizado.

A ossificação endocondral ocorre nos ossos longos dos membros, parte basal do crânio, vértebras, costelas e parte medial das clavículas. Este processo ocorre sobre um molde de cartilagem hialina, considerados modelos dos futuros ossos, iniciando-se com a hipertrofia dos condrócitos, produção de colágeno X e morte dos condrócitos por apoptose. Em seguida, as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e por CMM provindas do periósteo e da medula óssea. Finalmente, as CMM se diferenciam em osteoblastos, as quais produzem matriz óssea sobre a cartilagem calcificada. Este processo é importante durante a consolidação óssea de ossos longos. (NAKASHIMA; DE CROMBRUGGHE, 2003; SHAPIRO, 2008; ARVIDSON et al., 2011; DAO et al., 2012; KINI; NANDEESH, 2012)

A consolidação óssea é um processo biológico complexo que envolve uma sequência de etapas que são iniciadas em resposta a uma lesão, resultando eventualmente no reparo e restauração da função do osso. Este processo envolve resposta da medula óssea, periósteo, córtex e partes moles adjacentes (ARVIDSON et al., 2011).

A consolidação óssea após uma fratura pode ser dividida em três fases: inflamação, reparação, e remodelação (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017). Na fase inflamatória, há uma formação de hematoma, as plaquetas são ativadas e degranuladas e as células inflamatórias são recrutadas para o local da fratura. A resposta inflamatória está associada a liberação de citocinas inflamatórias, capazes de iniciar uma série de eventos celulares importantes para a reparação óssea, como o recrutamento, proliferação e a diferenciação das CMM indiferenciadas (DIRCKX; HUL; MAES, 2013). Na fase de renovação, são formados novos vasos sanguíneos com ajuda de células endoteliais provenientes dos vasos periosteais e dos músculos circundantes. As CMM recrutadas para o local da lesão proliferam e se diferenciam em condrócitos para formar o calo mole (ossificação endocondral) ou em osteoblastos para formar o calo duro ou osteoide (ossificação intramembranosa). O calo mole é gradualmente substituído por tecido ósseo imaturo ou osteoide (DIRCKX; HUL; MAES, 2013; MAJIDINIA; YOUSEFI, 2017). Na fase de remodelação, o osso imaturo é transformado pelas ações dos osteoclastos e osteoblastos em osso maduro, restabelecendo a forma, força e função do osso antes da fratura (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; DIRCKX; HUL; MAES, 2013). A cicatrização óssea em adultos retrata o desenvolvimento normal que ocorre

durante a embriogênese, exceto a inflamação associada (ARVIDSON et al., 2011).

Apesar de ter um mecanismo natural bem desenvolvido da consolidação óssea, alterações dos fatores locais e sistêmicos poderiam causar um problema na consolidação, como no caso da pseudoartrose congênita da tíbia.

1.3 Pseudoartrose Congênita da Tíbia e Tecido ósseo (PCT)

1.3.1 Difinição

Pseudoartrose ou "falsa articulação" é um termo usado para definir a não consolidação de uma fratura, quando o processo de reparação óssea, por algum motivo deixou de atuar (FERREIRA et al., 2009). A pseudoartrose pode ser uma complicação no local da fratura ou pode estar associada a outras doenças como: neurofibromatose, displasia fibrosa ou osteogênese imperfeita (AL-HADIDY et al., 2007)(AL-HADIDY et al., 2007). Além disso, também pode ser uma doença congênita isolada sem associação a nenhuma doença já conhecida. (AL-HADIDY et al., 2007).

A Pseudartrose Congênita resulta da falha do crescimento ósseo normal e da falha de formação do calo após uma fratura e tem sido reportado em ossos longos, como a tíbia (AL-HADIDY et al., 2007), fíbula (HEFTI et al., 2000) , ulna (RAMELLI et al., 2001), raio (MUKHOPADHAYA; SHIVAPURI, 2006), fêmur (AL-HATHAL et al., 2000) e clavícula (LELEI, 2005), sendo a tíbia o local mais comum de ocurrer.

A Pseudoartrose Congênita da Tíbia (PCT) é um dos problemas mais desafiantes da ortopedia pediátrica pela dificuldade em obter a união óssea e quando possível, em mantê-la (EI-ROSASY et al., 2007). Esta doença refere-se a um tipo específico de não consolidação óssea da diáfise da tíbia, que pode estar bem estabelecida ou incompletamente desenvolvida no nascimento (DELGADO-MARTÍNEZ; RODRÍGUEZ-MERCHAN; OLSEN, 1996).

A PCT é uma doença rara. Andersen et al.(1972) relatam uma incidência de um para cada 140.000 nascidos vivos na Dinamarca. Na Itália, no Instituto Rizzoli, apenas 50 pacientes foram tratados durante 50 anos (BONGIOVANNI et al., 1996), e a incidência dessa doença no Brasil ainda não foi reportada.

Em 1708, foi historicamente reconhecida pela primeira vez como entidade clínica por Hatzoecher (BONGIOVANNI et al., 1996). Anos mais tarde, Paget (1891) descreveu pela primeira vez um caso da PCT (HEFTI et al., 2000).

1.3.2 Manifestação clínica

A manifestação clínica pode variar consideravelmente, desde uma simples inclinação anterolateral da tíbia até uma inclinação severa da tíbia e da fíbula, seguida por fratura e pseudartrose. A presença da inclinação tibial, geralmente está presente no nascimento ou na primeira semana de vida (PANNIER, 2011). Essa inclinação, combinada com uma diminuição no crescimento da tíbia distal, resulta no encurtamento do membro (PATWA; PATEL, 2013). As fraturas ocorrem quando a criança se levanta e começa a andar, geralmente de forma espontânea ou depois de um trauma menor. A regeneração óssea no local da fratura é insuficiente tendo como resultado formação da pseudoartrose (SAKAMOTO et al., 2007).

A maioria dos casos de CPT é unilateral, localizado no terço médio e inferior da diáfise tibial. A fíbula também pode ser afetada em mais da metade dos casos (BERKSHIRE; MAXWELL; SAMS, 1970; HEFTI et al., 2000). O pé na extremidade envolvida pode ser normal ou ligeiramente menor que o pé contralateral (PATWA; PATEL, 2013). Não há predominância para o sexo nem preferencia para o lado (PANNIER, 2011).

1.3.3 Etiologia

A etiologia da PCT ainda é incerta, existem teorias propostas na literatura de origem mecânica, vascular ou genética, mas nenhuma delas consegue explicar totalmente a patologia nem sua localização preferencial (PANNIER, 2011). Segundo Paley a lesão tem origem no periósteo, o qual é constituído de um tecido fibroso espesso que leva a constrição óssea e a alteração vascular.

O que se sabe é que aproximadamente 50% dos casos de PCT estão

associados à neurofibromatose tipo 1 (NF1) conhecida também como doença de Von Recklinghausen (HEFTI et al., 2000). Trata-se de uma doença genética multissistêmica autossômica dominante que afeta aproximadamente um para cada 3.500 nascidos vivos (BOYD; KORF; THEOS, 2009). Essa doença é causada por mutação no gene NF1(HONG SHEN MING., HARPER S PETER, 1996), O qual codifica a neurofibromina, uma proteína supressora de tumor que é expressa em muitos tipos de células, incluindo células ósseas como: condrócitos maduros, condrócitos hipertróficos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (LEE et al., 2011). Esta proteína regula negativamente a atividade da molécula sinalizadora intracelular RAS, uma proteína envolvida na proliferação e diferenciação celular (BOLLAG et al., 1996). A perda da função da neurofibromina pode levar a uma anomalia da via RAS-MAPK tendo como resultado uma diferenciação osteoblástica defeituosa. Além disso, uma alta expressão da proteina RAS pode resultar em aumento na atividade dos osteoclastos e seus precursores, explicando a resposta óssea na CPT e a alta taxa de fraturas recorrentes (PANNIER, 2011).

Nos casos de PCT não relacionados à neurofibromatose, uma possível causa de defeito primário na cartilagem da tíbia embrionária tem sido sugerida devido ao ápice da inclinação e o estreitamento do canal medular ser o centro de ossificação primária da tíbia (HEFTI et al., 2000).

1.3.3 Patologia

Estudos histopatológicos da área de pseudoartrose descrevem que a patologia principal é a presença de tecido fibroso denso, conhecido também como hamartoma fibroso (BOYD, 1982; CHO et al., 2008). Este tecido interfere com a produção óssea e uma formação normal do calo (DELGADO-MARTÍNEZ; RODRÍGUEZ-MERCHAN; OLSEN, 1996) A maioria das células identificadas no tecido fibroso foram fibroblastos hiperplásicos (BROWN; OSEBOLD; PONSETI, 1977; SHADI, 2012). Outros elementos encontrados neste tecido foram a presença de uma variável mistura de fibrocartilagem e cartilagem hialina com evidências de ossificação endocondral (IPPOLITO et al., 2000; MARIAUD-SCHMIDT et al., 2005). Outros estudos demonstraram que

na área da lesão a vascularização é deficiente, a capacidade osteogênica é diminuída e que a atividade osteoclástica é alta, sendo estas duas últimas responsáveis por um defeito na remodelação óssea. (BOYD, 1982; CHO et al., 2008; LEE et al., 2011). O aumento da atividade osteoclástica tem sido descrito nas superfícies ósseas corticais em contato com o hamartoma fibroso (IPPOLITO et al., 2000). A natureza osteolítica do tecido fibroso, é mais pronunciada em crianças pequenas e, aparentemente diminui com o crescimento e desaparece na maturidade esquelética (BOYD, 1982).

O harmatoma fibroso está localizado no periósteo e entre os focos de fratura causando compressão, osteólise e persistência da pseudoartrose (SHADI, 2012).

Análise macroscópica mostra que a estrutura óssea no local da pseudartrose é completamente diferente em comparação ao osso normal (BROWN; OSEBOLD; PONSETI, 1977; IPPOLITO et al., 2000; HERMANNS-SACHWEH et al., 2005; TIKKANEN et al., 2010; LEE et al., 2011)-Figura 1.



Figura 1- Análise macroscópica da PCT. No local da pseudartrose a estrutura óssea é completamente desorganizada, O periósteo está espessado com o tecido fibroso, a estrutura do osso cortical é mais heterogênea e apresenta áreas mais desorganizadas similares ao osso trabecular. O osso trabecular e a cavidade medular estão totalmente substituídos pelo tecido fibroso. Fonte: HERMANNS-SACHWEH et al., 2005.

1.3.4 Classificação

A classificação desta doença é difícil devido a sua diversidade clínica e patológica. Há numerosas classificações descritas na literatura, mas nenhuma delas é universal. Para a classificação desta doença, pode ser considerado o tempo de aparecimento, a mobilidade dos fragmentos e/ou os achados radiológicos.

A Classificação de Crawford (CRAWFORD; BAGAMERY, 1986), que é atualmente a mais usada, descreve e identifica os diferentes estágios de progressão da PCT:

- tipo I: inclinação anterior e aumento na densidade cortical e estreitamento do canal medular

- tipo II: inclinação anterior, estreitamento e esclerose medular.

- tipo III: inclinação anterior com cistos ou sinais "pré-fratura"

- tipo IV: inclinação anterior, fratura e pseudoartrose.

1.3.5 Tratamento

O tratamento de PCT é muito controverso e polêmica. Há numerosos métodos de tratamento propostos baseados no conceito biológico ou mecânico, podendo ser cirúrgico ou não, com taxas muito variáveis de sucesso (GIULIANI et al., 2013). Houve uma relativa melhora no prognostico da doença nas últimas décadas, mesmo assim, muitas intervenções ainda são necessárias e a amputação é muitas vezes a melhor opção (AITKEN, 1959). O objetivo principal do tratamento do PCT é obter e manter a união óssea minimizando a deformidade da perna e tornozelo. (SHADI, 2012; PATWA; PATEL, 2013).

O tratamento cirúrgico é amplamente aceito como o tratamento para a PCT. Este tipo de tratamento baseia-se em dois princípios: biológico e mecânico. O princípio biológico se refere à ressecção total do tecido fibroso, tanto ósseo como macio, para delimitar as bordas completamente livres de lesão e deixar bem vascularizado. O princípio mecânico refere-se à estabilização da diáfise da tíbia para evitar a reabsorção dos enxertos e, assim, promover a consolidação. (PANNIER, 2011; SHAHEEN; KHALIL, 2015). Além disso, deve-se buscar que o controle da doença seja obtido com o mínimo de

procedimentos cirúrgicos e com boa funcionalidade (SHADI, 2012). Os principais tratamentos cirúrgicos que conseguem uma melhor taxa de consolidação são a técnica de Ilizarov, enxerto vascularizado de fíbula e fixação intramedular com enxerto ósseo (PANNIER, 2011). As complicações deste tipo de tratamento incluem a rigidez do tornozelo, o valgo da parte posterior do pé, a deformidade do tornozelo, a refratura e o encurtamento da tíbia (SHAHEEN; KHALIL, 2015).

A associação dos princípios mecânicos clássicos e biológicos, como enxertos ósseos e outras tecnologias mais modernas que induzem a formação óssea como as proteínas formadoras de osso e enxertos celulares, podem trazer melhoras para o prognostico ainda sombrio da PCT (TIKKANEN et al., 2010).

1.3.2 Peudoartrose congênita da tíbia e CMM

As primeiras evidências das CMM como responsáveis pela patogênese da PCT foram demonstradas em estudos histopatológicos (MARIAUD-SCHMIDT et al., 2005; SAKAMOTO et al., 2007). No local da pseudoartrose foram identificados tecidos similares a tecido mesenquimatoso, capaz de dar origem a diferentes tipos de tecidos como osso, cartilagem, tecido fibroso e tecido neural. Foi sugerido que este tecido é incapaz de se diferenciar em osteoblastos funcionais e, além disso, elas sofrem um desvio para a diferenciação em miofibroblastos e condrócitos.

Estudos posteriores foram tentaram compreender o comportamento biológico do tecido fibroso presente no local da lesão. Foi demostrado que o tecido fibroso possui células com características similares a CMM (CHO et al., 2008; LEE et al., 2012; DIAZ-SOLANO et al., 2015).

Estudos moleculares das CMM do tecido fibroso mostraram uma falha no processo final da diferenciação osteogênica, demonstrando assim que o problema da consolidação poderia ser a falta de osteoblastos funcionais capazes de formar a matriz óssea (LEE et al., 2011).

Esses estudos se enfocaram investigar CMM derivadas do periósteo, e recentemente, há estudos sobre CMM isoladas da medula óssea do local da lesão de PCT e da crista ilíaca não afetada do mesmo paciente com PCT.

(LESKELÄ et al., 2009; GRANCHI et al., 2010). Estes estudos demostraram que o potencial de formação óssea in vitro é menor em CMM da tíbia afetada.

Os estudos com CMM na pesquisa da PCT se concentraram em CMM isoladas da medula óssea do local da lesão e da crista ilíaca não afetada. Dessa forma, ainda não existem trabalhos que relatam a utilização das CMM na crista ilíaca afetada e da tíbia contralateral.

A PCT é um problema desafiante da ortopedia pediátrica, devido ao 23

pouco conhecimento de sua patogênese e altos índices de insucesso na terapia. O conhecimento mais amplia das CMM da medula óssea de pacientes com PCT auxiliaria na compreensão da patogênese da doença. Além disso, o conhecimento obtido neste estudo pode ser útil para desenvolver estratégias de tratamento usando CMM.

2 HIPÓTESE

A Hipótese desse trabalho é que o comportamento biológico das CMM isoladas de diferentes regiões anatômicas da medula óssea de pacientes com PCT é diferente.

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo geral

Analisar as características biológicas das células estromais mesenquimais multipotentes isoladas de diferentes regiões anatômicas de medula óssea de pacientes com pseudartrose congênita da tíbia.

3.3 Objetivos específicos

 Isolar e expandir as células estromais mesenquimais multipotentes derivadas dos diferentes regiões anatômicas de medula óssea de pacientes com PCT;

2. Avaliar a capacidade de formação de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F), bem como a morfologia, expressão de antígenos e a capacidade de diferenciação em osteócito, adipócito e condrócito;

 Analisar o potencial de proliferação das CMM isoladas dos diferentes regiões anatômicos da medula óssea de pacientes com PCT

4. Quantificar as proteínas secretadas pelas CMM isoladas dos diferentes regiões anatômicas da medula óssea de pacientes com PCT;

5. Avaliar o potencial de diferenciação osteogênica das CMM isoladas dos diferentes regiões anatômicos da medula óssea de pacientes com PCT.

6. Comparar a expressão dos genes relacionados à diferenciação osteogênica das CMM isoladas dos diferentes regiões anatômicos da medula óssea de pacientes com PCT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) (CAAE: 59023316.0.0000.5440). Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados sobre o procedimento de coleta de amostra biológica e sua utilização no estudo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido necessário para a coleta do material biológico foi obtido de forma voluntária pelos responsáveis legais. No caso dos pacientes com PCT também foi necessário obter o Termo de Assentimento Livre e esclarecido.

O material biológico e amostras remanescentes deste projeto foram conservados e estocados no Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo CRH-HC-FMRP-USP (processo HCRP 920/2009).

4.2 Casuística

Foram selecionados pacientes de ambos os sexos que concordassem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e atendessem os seguintes critérios de inclusão: Crianças em seguimento no ambulatório de ortopedia infantil da HCFMRP-USP que foram submetidas a tratamento cirúrgico para PCT e não estar associado a NF1. Neste estudo foram utilizados amostras de medula óssea de três pacientes com PCT.

O grupo controle foi composto de dois doadores de medula óssea do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. Foi incluído dois doadores de medula óssea entre 18 e 30 anos de idade e sem qualquer tipo de alteração óssea.

4.3 Coleta de amostras de medula óssea

Em pacientes com PCT, a coleta de amostra de medula óssea foi realizada de diferentes régios anatômicos do mesmo paciente: tíbia afetada pela doença, tíbia contralateral não afetada, crista ilíaca do membro afetado pela doença e crista ilíaca do membro não afetada. A coleta foi feita durante a cirurgia de ressecção do tecido doente, e instalação do fixador externo circular de Ilizarov realizada pelo serviço de ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

A coleta de amostra da crista ilíaca afetada e não afetada foi feita por punção do lado anterossuperior. No caso da tíbia afetada, a medula óssea foi coletada perto do local da lesão, quanto à tíbia contralateral foi feita por punção do extremo superior. A coleta foi feita após antissepsia com clorexidina alcoólica e anestesia raquidiana e/ou geral. Aproximadamente 5 a 10 ml de amostra foi coletada de cada região e acondicionado em tubo com anticoagulante heparina sódica (BD vacutainerTM Becton Dickinson) e imediatamente processadas. As amostras controle foram colhidas no bloco cirúrgico do Hospital das Clinicas de Ribeirão Preto unidade de transplante de medula óssea

4.4 Isolamento e cultivo das CMM.

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-PaqueTM Plus (Histopaque-1077, GE Health Care BioSciences, Upsala, Suécia) de densidade 1077 g/mL conforme descrito a seguir. Primeiramente a amostra de medula óssea é transferida para um tubo cônico de 50 mL e depois é adicionada PBS 1X contendo ACD a 0,6% até a marca de 30 mL, após delicada homogeneização, foi acrescentado lentamente e de forma contínua 13 mL da solução Ficoll-paque.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2000 RPM por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este processo, o anel de células mononucleares presente na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X contendo

de 0.6% de ACD e centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos a temperatura

27

ambiente. O botão de células obtido após o ultimo lavagem foi contada em câmara de Neubauer.

Finalmente as células mononucleares isoladas foram plaqueadas em garrafas de cultura celular de 75 cm2 (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) contendo 15 ml de meio α-MEM (Gibco BRL, Life Technologies, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) (HyCloneTM), 2,3 g/L de Hepes (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e de 100 U/L penicilina/streptomicina (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO2 e 80% de umidade

Após 3 a 7 dias de cultivo, houve a troca de todo o meio, para retirar as células não aderidas na garrafa. Passado este período inicial, o meio foi trocado duas vezes por semana e mantidas até a confluência de 80-100%, quando as células foram então tripsinizadas com o uso de tripsina recombinante (Invirogen).

Após a tripsinização, alíquotas de 2x105 células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm2 em 15 ml de meio α-MEM suplementado com 15% SFB. A cada processo de tripsinização contou-se uma passagem. As células foram expandidas até a terceira passagem.

4.5 Quantificação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F)

As células mononucleares separadas pelo gradiente de Ficoll foram também plaqueadas em quatro placas quadriculadas de 35 mm2 (Greiner bioone) em uma densidade de 1x105células /placa em meio α-MEM suplementado com 15% SFB e mantidas em estufa a 37°C com 5%, de CO2 e o meio renovado a cada 48-72 horas. Ao final do 14° dia de cultivo, as células foram coradas com corante Leishman (Doles) por 5 minutos, e quantificadas às colônias com mais de 50 células fibroblastoides com o auxilio de microscópio de contraste de fase (Olympus IX50). A quantificação das CFU-F é dada pelo número de colônias com mais de 50 células dividido pelo número total de células mononucleadas plaqueadas.

4.6 Caracterização morfológica das CMM.

A morfologia de CMM foi observada por microscopia de contraste de fase em microscópio óptico invertido, continuamente ao longo de todo o cultivo. Para uma caracterização morfológica mais específica, as CMMs isoladas foram tripsinizadas e plaqueadas em lamínulas de 13 mm sob placas de cultura de 24 poços e cultivadas por 24h. Após o período de cultivo as CMMs foram submetidas à coloração com corante de Leishman (Doles), para logo ser analisadas em microscopia óptica convencional.

4.7 Caracterização imunofenotípica das CMM.

Na terceira passagem, as amostras de CMM foram analisadas a seus antígenos de superfície celular, por meio de uma marcação com anticorpos monoclonais específicos (imunofenotipagem). A aquisição e a análise foram realizadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dikinson BD, San Jose, CA, USA) utilizando o software MultiSet (Becton Dikinson, BD, San Jose, CA, USA).

Foi estabelecido um painel de 14 anticorpos monoclonais utilizado para a imunomarcação das CMM: CD90, CD73 e CD105, CD146, CD166, CD13, CD29 e HLA-ABC, CD 34, CD14, CD45, CD31 e HLA-DR. Os fluorocromos conjugados com os anticorpos monoclonais foi: FITC, PE, PerCP e APC.

Suspensões celulares contendo 1x105 células foram marcadas com 0,1 ug de cada anticorpo e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X e analisadas no citômetro de fluxo.

4.8 Capacidade de diferenciacao celular em linhagens mesodérmicas.

4.8.1 Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi realizada em placas de 24 poços (Greiner, Alemanha), previamente montadas com pequenas lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro (Gold Lab, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Foram

plaqueadas suspenções celulares contendo 4x104 células/poço para diferenciação e 5x103 células/poço para o controle. Foi utilizado o meio α-MEM com 15%SFB e mantidos sob as mesmas condições anteriormente descritas.

O protocolo de indução foi iniciado no mínimo 24 horas após o inicio do cultivo, permitindo as CMM aderirem na lamínula e atingirem aproximadamente uma confluência de 40-60%. Após alcançar a confluência desejada, o meio de cada poço foi removido e em seguida, foi adicionado o meio indutor de diferenciação específico para osteócito. Para as células do controle negativo, ou seja, CMM indiferenciadas foram utilizadas o meio α -MEM suplementado somente com 7,5% SBF (Hyclone) sem a presença de indutores de diferenciação. O meio indutor utilizado para a diferenciação em osteócito foi usado o meio α -MEM, suplementado com 7,5% SBF (Hyclone), 0,1 mM de dexametasona (Decadron Injetável, Prodome, São Paulo, Brasil), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerolfosfato (Reagem, Rio de janeiro, Brasil).

As placas foram mantidas em estufa com 80% de umidade, a 37°C com 5% de CO2 e os meios trocados duas vezes por semana. As células foram monitorizadas por microscopia de contraste de fase (Olympus, IX71) até o surgimento de indícios da diferenciação celular.

Para verificar a diferenciação osteogênica será realizada a coloração de Alizarin Red. As culturas de células diferenciadas e os controles foram lavados uma vez com PBS 1X, fixadas por 30 minutos com 500 µL de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a TA. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com água mili-Q (Millipore) e incubadas com 500 µL de corante Alizarin Red por 30 minutos, no escuro. Logo depois, foi lavado repetidamente com agua mili-Q para remover o excesso de corante. Por ultimo, as lamínulas foram montadas em Permount SP 15 (Fisher, Inglaterra) e visualizadas em microscopia óptica de campo claro (Carl Zeis, Alemanha), e as imagens adquiridas na câmera digital Axiocam (Carl Zeis, Alemanha).

4.8.2 Diferenciação Adipogênica

A metodologia de preparação das laminas e cultivo foi semelhante à utilizada com a diferenciação osteogênica. O meio indutor utilizado para a diferenciação em adipócito foi o meio α-MEM com 15% SBF (Hyclone), 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 2,5 mg/mL de insulina e

100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

Para verificar a diferenciação adipogênica foi realizada a coloração de Oil Red. As culturas diferenciadas e seus controles foram lavados uma vez com PBS 1X e fixadas com 500 µL de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada isopropanol 60% e incubada por 5 minutos. Depois foi adicionado o corante Oil Red e icubada por 5 min. A seguir foi adicionada hematoxilina e incubada por 5 minutos. Por ultimo, as lamínulas foram montadas com gliceraldehido e imagens adquiridas na câmera digital Axiocam (Carl Zeis, Alemanha).

4.8.3 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação em condrócitos suspenções celulares contendo 1x106 células para diferenciação e controle foi ressupendidos em meio α-MEM, suplementado com 15% SBF (Hyclone) e centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos em tubo de polipropilenos de 15 ml para formação de um pellet celular de alta densidade. A maior quantidade de sobrenadante era removido para ter no final aproximadamente um volumem de 80-100 uL de suspensão celular. Para formar uma micromassa de células foi colocada 5ul da suspenção celular em vários pontos (separado por uma distancia de 2 mm) da placa de 100 mm de diâmetro com quatro divisões e mantida na estufa a 37°C com 5% CO2 por 1 hora. Em seguida, foi adicionada o meio indutor para condrócito acrescido com TGF-β3 (Prepo Tech), para o controle o meio adicionado foi o meio indutor sem TGF-β3. A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% CO2 e os meios renovados duas vezes por semana por um período de 14 dias.

O meio indutor de diferenciação em condrócito foi o meio DMEN (Gibco) sem SFB suplementado com 100 mM de piruvato de sódio (Sigma), 20% de albumina, 20 mM de ácido ascórbico (Sigma), 1 mM de dexametasona (Sigma) e 10 uL/mL de TGF-beta (PrepoTech).

Para análise histoquímica e de coloração das micromasas de células foi fixado com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente e incluído em solução crioprotetora (Tissue-Tek® O.C.T) para congelamento em

acetona gelada. Secções de 5µm eram realizadas e os cortes submetidos a coloração com Azul de Alcian (Sigma).

4.12 Análise do potencial proliferativo

Para análise do potencial proliferativo das CMM obtida, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 1x104 células/poço, sendo o experimento de cada população realizada em triplicata. As células foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% CO2, com o meio trocado a cada 48-72 horas até atingirem uma confluência de aproximada de 90%. Ao atingirem esta confluência as células eram tripsinizadas separadamente, contadas em câmera de Neubauer com Azul de Trypan (Gibco) e plaqueadas novamente como no inicio. O ensaio foi conduzido até a passagem 10. O potencial proliferativo das CMM foi avaliado com base no cálculo do número de gerações ("population doubling" ou PD) obtido pelas CMM em cultura:

PD = Log(Nf/No)/Log2,

Onde Nf = número final de células obtidas ao final de cada passagem e No= número inicial de células plaqueadas.

Por outro lado, o tempo de divisão celular ("doubling time" ou DT) das CMM será calculado com base na seguinte fórmula:

$$DT = PD/T$$

Onde PD = Numero de gerações e T = quantidade de tempo (horas) em que as células ficarão em cultura.

4.13 Análises das proteínas secretadas pelas CMM

O ensaio para análise dos níveis das proteínas secretadas pelas CMM foi utilizado o sobrenadante de cultura destas células. O experimento foi realizado em triplicata. O método utilizado para este ensaio é a tecnologia Luminex®. Esta tecnologia permite a detecção e quantificação simultânea de múltiplos biomarcadores (até 100) em uma mesma amostra. A detecção é realizada em amostras pequenas, aproximadamente 50 µl.

O principio do ensaio Luminex® é similar ao ELISA "sanduíche", associado à citometria de fluxo. Este ensaio utiliza microesferas magnéticas fluorescentes revestidas com anticorpos específicos para cada alvo estudado. Anticorpos biotinilados de detecção são adicionados para criar o complexo "sanduíche", que é ligado ao conjugado estraptavidina-ficoeritrina. O complexo, então, emite sinal fluorescente que é captado por dois lasers: um deles identifica e classifica a microesfera, e outro quantifica o biomarcador. Um processador digital captura esses dados e os envia ao software de análise da plataforma de Luminex®.

As proteínas analisadas foram: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, HGF, GM-CSF, CCL2, CCL3, CCL4, CX3CL1, CXCL8 e CXCL10. O kit utilizado foi Human Premixed Multi-Analyte® (R&D Systems, Boston, MA, USA). Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

Prévio ao ensaio, as amostras foram centrifugadas a 1200 RPM por 10 minutos. As amostras foram diluídas com o tampão especifico do kit (1:2). Amostras e os padrões foram pipetados (50 µl) em uma placa com 96 poços. Em seguida, foram adicionadas 50 µl das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais. Foram incubadas por 2 horas em um agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital - IKA® Werke Staufen, Alemanha) protegidas da luz e a temperatura ambiente (20-25°C). Após o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem para remover os reagentes não aderidos. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex® pro II wash Station) na qual as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um imã. A seguir, 50 µl de anticorpos secundários biotenilados foram adicionadas em cada poço e incubadas por uma hora. Repetimos o procedimento de lavagem da placa, e adicionar 50 µl de estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente ficoeritrina e incubada durante 30 minutos. Repetimos novamente o procedimento de lavagem da placa. Em seguida, foram adicionadas 100 µl de tampão de lavagem para ser analisadas na plataforma Luminex® MAGPIX®.

As concentrações das amostras analisadas foram calculadas a partir da curva padrão, obtidas por meio do software xPONENT® (Merck Millipore CO.,

33

Darmstadt, Alemanha). Os níveis das proteínas foram expressos em pg/mL.

4.14 Análises do potencial da diferenciação osteogênica

4.14.1 Determinação da atividade de fosfatase alcalina

Para este ensaio as CMM foram cultivadas em placas de 96 poços com 0.2x103 células/poço. Após 48 horas foram submetidos à diferenciação osteogênica, e o meio foi trocado duas vezes por semana.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP, do inglês) foi avaliada aos 7 e 14 dias de diferenciação osteogênica, utilizando o kit de substrato fluorescente de ALP (Vector Laboratories), de acordo com o protocolo do fabricante. Cada placa correspondente ao período de diferenciação foi lavada duas vezes com 100 ul de PBS 1X . Depois dos lavados, foi adicionada 50 ul da solução de trabalho, o substrato *Vector*® *Red* e incubada durante 1 h a temperatura ambiente e no escuro. Passado o período da reação, os poços foram lavados três vezes com 100 ul de PBS 1X e fixados com 100 ul de parafolmaldeído 2% por 15 minutos. Após o período de fixação, os poços foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com 50 ul de corante fluorescente de DNA *Hoechst,* juntamente com o corante de citoplasma *CellMaskBlue* durante 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Após uma lavagem, as células foram avaliadas por microscopia automatizada pela plataforma de *High Content Screeing* e para análise das imagens obtidas foi utilizada o programa *CellProfiler.*

4.14.2 Análise da formação da matriz mineralizada

Para este ensaio, as células se cultivaram em garrafas de 25 cm2 com uma densidade de 5x104 células/g-25 cm2 e foi induzida quando a confluência atingiu a 40-60%, o meio indutor de diferenciação osteogênica foi trocado duas vezes por semana por um período de 21 dias.

Após os 21 dias, as culturas de células diferenciadas em osteoblastos foram lavadas com PBS 1X, fixada com paraformaldehido 10% por 1 hora. Após este tempo, foram lavadas duas vezes com agua MiliQ. Em seguida, foi corada com vermelho de alizarina (Alizarin Red S, sigma) a temperatura ambiente e no escuro por 45 minutos. Após, foi lavada 4 e armazenadas a -20 até a remoção do corante

Para recuperação do corante foi adicionada 1mL de acido acético 10% e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos com agitação constante. A monocamada de células foi removida e transferida para tubos de propileno de 2mL. Em seguida, foi adicionado sobre a suspenção de células 200 μ L de óleo mineral, a fim de evitar a evaporação do acido acético, e aquecido em banho seco a 85 °C por 10 minutos. Após, os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos e em seguida foram centrifugados a 18.000 RPM por 7 minutos. Aproximadamente 600 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de polipropileno de 1mL e a solução neutralizada com 150-200 μ L de hidróxido de amônio 10% (pH = 4.1- 4,5).

O corante recuperado foi pipetado 100 ul em placas de 96 poços e a concentração determinada através da análise da absorbância em 405nm no aparelho *SpectraMax M5 Multimode Microplate Readers (Molecular Devises)*. A formação de matriz extracelular mineralizada foi expressa como absorbância.

4.14.3 Análise da expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteogênica

Para este ensaio, as CMM foram cultivadas quatro garrafas de 25 cm2 com uma densidade de 5x104 células/g-25 cm2. Quando a confluência atingiu a 40-60%, três garrafas foram induzidas para diferenciação osteogênica como já foi descrito anteriormente e o meio foi trocado duas vezes por semana até o dia 21. Quando a confluência atingiu a 70-90%, as células da garrafa que não foi induzida (T0) foram coletadas para extração de RNA. A coleta de células para extração de RNA a partir das garrafas induzidas para diferenciação foi realizada nos dias 7 (T7), 14 (T14) e 21 (T21) da diferenciação.

4.14.3.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total de cada uma das culturas (T0, T7, T14 e T21) foi realizado pelo método *TRIZOL Reagent (InvetrogemTM , Life Technologies,*

CA, USA), segundo instruções do fabricante. Após precipitação, o RNA extraído foi diluído em agua e estocado a -80°C. O RNA foi quantificado no

espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo, Scientific) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi avaliado quanto à integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose 2%. A partir do RNA total, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA).

4.14.3.2 Reação de Transcrição Reversa

O RNA total foi transcrito em cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. Para um volume final de 25 ul foram utilizados 2,5 ul de tampão de RT (10X), 2 ul de mix dNTP (100Mm), 2,5 ul de random primers (10X), 0,075 ul de RNAse inhibitor, 1.25 ul da enzima multiSribeTM Reverse Transcriptase, 2 ug de RNA e água DEPC suficiente para ajustar o volume. A reação foi transcrita no termociclador *Veritl^R 96 well Thermal Cycler (Life Technologies)* de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 25°C durante 10 minutos seguida por 37°C por 120 minutos. Após a transcrição, o cDNA foi estocado a -20°C.

4.14.3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Para quantificação da expressão genica foi utilizado a metodologia TaqManTM e foram utilizadas sondas específicas para os genes relacionados com a diferenciação osteogênica (Tabela 1). A normalização da reação foi feita pela quantificação de três genes endógenos (Tabela1). Na reação foi utilizada 5,0 ul de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 2,0 ul de sonda específica (40X), 2 ul de cDNA diluído 1:5 (v/v) e água DEPC suficiente para um volue final de 10 ul de reação. Todas as reaccoes foram realizadas em duplicata e o nível de expressão dos genes foi calculado pelo método de unidades relativas de expressão (URE).

Tabela 1 - Relação de sondas $TaqMan^{TM}$ (*Life Technologies*) utilizadas para análise da expressão genica por PCR em tempo real.

Gene	Sonda	Característica
RUNX2	Hs00231692_m1	Osteogênica
BGLAP	Hs01587813_g1	Osteogênica
SPP1	Hs00959010_m1	Osteogênica
SPARC	Hs00234160_m1	Osteogênica
ALPL	Hs01029144_m1	Osteogênica
BMP2	Hs00154192_m1	Osteogênica
COL1A1	Hs00164004_m1	Osteogênica
IBSP	Hs00173720_m1	Osteogênica
SP7	Hs00541729_m1	Osteogênica
АСТВ	4326315E	Endógeno
GAPDH	4310884-E	Endógeno
HPRT		Endógeno

4.15 Análises do potencial da diferenciação em adipócitos

As CMMs foram cultivadas em placas de 96 poços com uma densidade 0.2x103 células/poço. Após 48 horas foram submetidos à diferenciação em adipócitos, e o meio foi trocado duas vezes por semana durante 14 dias. Para identificar os vacúolos lipídicos se utilizou o kit de corante fluorescente BODIPY 493/503 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos no escuro. A seguir, foi lavado uma vez com PBS 1x e adicionada 50 ul do corante BODIPY 493/503 e incubada 1 hora a 37°C. Foi repetida a lavagem por três vezes e adicionada 50 ul de corante fluorescente de DNA Hoechst, juntamente com o corante de citoplasma *CellMaskBlue* e incubada por 30 minutos. Finalmente, depois de

uma lavagem as células foram avaliadas por microscopia automatizada pela plataforma de *High Content Screeing* e para análise das imagens obtidas foi utilizada o programa *CellProfiler*.

4.13 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados aplicando o *Kruskal–Wallis test* usando *GraphPad InStat software*, versão 5.0 para Windows *(GraphPad software; www.graphpad.com)* e foram considerados significantes os dados com p<0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

Na tabela 2, ilustra as características clinicas dos pacientes incluídos no estudo. O primeiro paciente (PCT1) de idade 10 anos, a tíbia afetada é o lado distal esquerda com presencia de pseudoartrose. O paciente dois (PCT2) de idade 14 anos, a tíbia distal direita é o lado afetado sem presencia de pseudoartrose (faz 5 anos realizou a remoção da pseudoartrose). O paciente três (PCT3), idade 9 anos, faz 3 anos que não apresenta a pseudoartrose. A cirurgia realizada no momento da coleta de amostras foi excisão completa da pseudoartose e colocação de fixador externo de Ilizarov no PCT1, osteotomía para de corrigir a curvatura da tíbia proximal direita no PCT2 e alongamento da tíbia afetada e correção do valgo respectivamente no PCT3.

Dados clínicos	PCT1	PCT2	РСТ3
Sexo	М	F	F
Idade (anos)	10	14	9
Antecedentes familiares	Não	Não	Não
Idade da primeira fratura (anos)	2	7	-
Número de cirurgias	8	5	6
Localização da lesão	Esquerda	Direita	Direita

Tabela 2 - Informações clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

5.2 Quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastóides

Na figura 3, observa-se que todas as células isoladas foram capazes de gerar colônias fibroblastóides. Após 7-10 dias foi possível observar a formação destas colônias aderidas ao plástico da garrafa. No paciente PCT, observa-se que as células isoladas da medula óssea da crista ilíaca do membro afetado (CIA) possuem um número significativamente maior de colônias em relação ao controle. No caso do paciente PCT2 se pode observar que as células isoladas da medula óssea da tíbia afetada (TA) possuem um número significativamente maior de colônias em relação ao controle colônias em relação às células da tíbia não afetada (TNA) e ao

controle. No paciente PCT3 se pode observar que as células da crista ilíaca não afetada (CINA) apresentam uma quantidade significativamente maior em relação às células da TA e ao controle.



Figura 2. Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F). Todas as células foram capazes de gerar CFU-F. Os asteriscos indicam resultados com diferenças significativas (*) p<0.05 (n=4).

5.3 Característica Morfológica das CMM de pacientes com PCT

Todas as células isoladas foram cultivadas até a terceira passagem. Nesta passagem todas as células apresentavam uma morfologia fibroblastóide, característica típica de uma CMM. A figura 1 ilustra imagens obtidas por microscopia de contraste de fase das células na terceira passagem.



Figura 3. Características morfológicas das CMM de pacientes com Pseudoartrose Congênita da Tíbia. CMM do paciente PCT1 aumento de 40X. CMM do paciente PCT2 aumento de 40X. CMM do paciente PCT3 aumento de 40X. As Fotografias demonstram que após a aderência ao plástico todas as células isoladas dos diferentes régios de medula óssea apresentaram características típicas de CMM.

5.4 Imunofenotipagem das CMM

Na tabela 3, observa-se que as células isoladas possuem características imunofenotípicas compatíveis com as das CMMs, isto é, expressão baixa o ausente dos marcadores de células hematopoiéticas (CD 34, CD14, CD45), endoteliais (CD31) e HLA-DR, e uma expressão significativa, mas em diferentes níveis de intensidade, dos antígenos CD90, CD73 e CD105, CD166, e HLA-ABC.

Antígenos de superfície (% de células positivas)											
Amostras	CD90	CD73	CD105	CD146	CD166	CD31	CD34	CD14	CD45	HLA- ABC	HLA- DR
				PCT	1						
CINA	99.5	96.3	97.3	91.7	95.6	0.7	1.2	0.7	1.2	95.5	7.4
CIA	9 7.7	89.5	93.4	83.2	86.8	1.8	2.8	1.2	1.5	85.8	6.1
TNA	98.6	94.0	96.3	82.5	87.1	0.3	0.5	0.5	0.3	91.9	4.7
TA	98.6	89.3	72.9	47.0	75.6	1.5	0.6	0.8	1.5	74.7	4.2
				PCT	2						
CINA	99.0	98.1	98.7	87.5	93.9	0.6	0.4	0.8	0.6	90.8	4.0
CIA	98.9	97.6	98.0	96.2	94.3	0.2	0.6	0.6	0.2	90.9	0.7
TNA	99.2	98.1	98.7	86.7	92.9	0.7	0.7	1.0	0.4	89.6	3.2
TA	98.0	92.8	94.7	28.8	84.0	0.2	0.3	0.6	0.4	68.2	1.3
				PCT	3						
CINA	99.3	98.0	98.8	98.1	96.3	0.7	0.5	0.2	0.4	96.9	0.5
CIA	98.9	97.5	96.8	96.2	95.6	0.2	0.1	0.1	0.2	96.9	0.3
TNA	97.4	96.3	96.8	94.6	93.7	0.4	0.1	0.2	0.2	95.8	0.5
TA	98 .7	95.6	95.7	89.4	90.0	0.2	0.2	0.2	0.2	94.5	0.7
CONTROLE											
CI	93.8	91.87	90.43	86.15	88.8	0.82	1.87	0.68	0.33	83.74	1.13

 Tabela 3 - Imunofenotipagem das CMM obtidas de pacientes com PCT e controle.

Quando se realizou a comparação do marcador CD146 das CMM isoladas do PCT1 e PCT2, nenhuma diferença significativa foi encontrada (Figura).

5.5 Capacidade de diferenciação celular em linhagens mesodérmicas

Para diferenciação in vitro, as CMM foram submetidas a processo de indução da diferenciação com estímulos específicos para osteócito, adipócito e condrócito.



Figura 4 - Avaliação do antígeno de superfície CD146. As CMM do PCT1 e PCT2 não apresentaram uma diferença significativa.

Diferenciação em osteócito.

Após a indução da CMM com meios apropriados para diferenciação em osteócitos, observou-se depositado de cálcio na matriz extracelular visualizado através da coloração Alizarin Red em todas as amostras de CMM de pacientes com PCT (Figura 5). A diferenciação foi visualizada entre 17 a 23 dias.

Diferenciação adipocítica

A avaliação das laminas após a coloração com Oil Red evidenciou-se que as CMM de pacientes com PCT têm a capacidade de diferenciação em adipócito com intensidades variáveis, a diferenciação foi evidenciada pela formação de vacúolos lipídicos. No caso das CMM isoladas da tíbia afetada, a diferenciação em adipócitos parece ser menor (Figura 6). A diferenciação foi visualizada entre 14 a 23 dias.

Diferenciação condrocítica

Após os 14 dias de estimulação com meio específico para diferenciação em condrócitos foi avaliada pela coloração azul de alciano que detecta glicosaminoglicanos. Observa-se que todas as CMM obtidas de pacientes com PCT foram capazes de se diferenciarem em condrócitos (figura 7).



Figura 5. Diferenciação osteogênica *in vitro* das CMM isoladas de diferentes locais da medula ossea dos três pacientes com PCT. Fotografias realizadas com aumento de 100X. Os depósitos de cálcio são evidenciados pela coloração *Alizarin Red*.



Figura 6 - Diferenciação em adipócito *in vitro* das CMM isoladas de diferentes locais da medula ossea dos três pacientes com PCT. Fotografias realizadas com microscopia de campo claro com aumento de 100x. Os vacúolos lipídicos são evidenciados pela coloração Oil Red.



Figura 6 - Diferenciação condrocítica *in vitro* das CMM isoladas de diferentes locais da medula ossea dos três pacientes com PCT. Fotografias realizadas com microscopia de campo claro com aumento de 400x. Presencia de glicosaminoglicanos é evidenciado pela coloração azul de alciano.

5.6 Formaco de matriz mineralizada

Após 21 dias de diferenciação osteocítica, a quantificado do corante Alizarin Red, mostrou significância estatística para os valores de absorvbancia (p<0.05), com as CMM da tíbia afetada < ilíaca não afetada.



Figura – 8 Quantificacao do corante Alizarin Red. medicição em absorbância a 405 nm. Os asteriscos indicam resultados com diferenças significativas (*) p<0.05 (n=3).

4.1 Análise das proteínas secretadas pelas CMM

As CMM usadas para análise das proteínas foram celulas indiferenciadas na terceira passagem. A análise foi realizada pela tecnologia Luminex. Na figura 9, observa-se que as CMM da tíbia afetada libera mais citocinas que o resto das celulas. Estatisticamente, só alguns são significativos.



Figura 9 - Análise das proteínas secretadas pelas CMM obtidas do PCT1. Os asteriscos indicam resultados com diferenças significativas (*) p<0.05 (n=3).

5. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther, v. 15, n. 2, p. 109-16, 2008.

ANDERSEN K.S. Congenital angulation of the lower leg and congenital pseudarthrosis of the tibia in Denmark. Acta Orthop Scand, v. 43, n.6, p. 539–549, 1972.

AGNIESZKA, A.; ZANNETTINO, A.; GRONTHOS, S. The Therapeutic Applications of Multipotential Mesenchymal / Stromal Stem Cells in Skeletal Tissue Repair. J Cell Physiol, v.218, n.2, p. 237-245, 2009.

AL-HADIDY, A. et al. Congenital pseudoarthrosis associated with venous malformation. Skeletal Radiology, v. 36, n. SUPPL. 1, p. 15–18, 2007.

AL-HATHAL, M. M. et al. Primary congenital pseudoarthrosis of the femur. Ann Saudi Med, v. 20, n. 3–4, p. 291–293, 2000.

ARVIDSON, K. et al. Bone regeneration and stem cells. J Cell Mol Med, v. 15, n. 4, p. 718–746, 2011.

BERKSHIRE, S. B. J.; MAXWELL, E. N.; SAMS, B. F. Bilateral symmetrical pseudarthrosis in a newborn. Radiology, v. 97, n. 2, p. 389–390, 1970.

BOBIS S, JAROCHA D, MAJKA M. Mesenchymal stem cells: characteristics and linical applications. Folia Histochem Cytobiol, v. 44, n.4, p. 215-30, 2006.

BONGIOVANNI, J. C. et al. Tratamento da pseudartrose congênita da tíbia (PCT) pelo método de llizarov *. v. 12, 1996.

BOLLAG, G. et al. Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. Nat Genet,v. 12, n. 2, p. 144–148, 1996.

BOYD, H.B. Pathology and natural history of congenital pseudarthrosis of the tibia. Clin Orthop, n.166, p. 5-13, 1982.

CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood, v. 98, n. 8, 2396-2402, 2001.

COVAS, D.T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

COVAS, D.T. et al. Exp.Cell Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena. vein Res., v. 309, n. 2, p. 340-344, 2005.

CHO, T. J. et al. Biologic characteristics of fibrous hamartoma from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type 1. J Bone Joint Surg Am, v. 90, n. 12, p. 2735–2744, 2008.

CRAWFORD JR AH, BAGAMERY N. Osseous manifestations of neurofibromatosis in childhood. J Pediatr Orthop v. 6, p. 72-88, 1986.

DAO, D. Y. et al. Cartilage-Specific B-Catenin Signaling Regulates Chondrocyte

Maturation, Generation of Ossification Centers, and Perichondrial Bone Formation During Skeletal Development. J Bone Miner Res, v. 27, n. 8, p. 1680-94, 2012.

DELGADO-MARTÍNEZ, A. D.; RODRÍGUEZ-MERCHAN, E. C.; OLSEN, B. Current concepts Congenital pseudarthrosis of the tibia. Int Orthop, v. 20, n. 3, p. 192–199, 1996.

DE BARI C. et al. . Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum. 44(8):1928-42. 2001.

DIAZ-SOLANO, D. et al. Isolation and Characterization of Multipotential Mesenchymal Stromal Cells from Congenital Pseudoarthrosis of the Tibia : Case Report. Anat Rec (Hoboken), v. 298, n. 10, p. 1804–1814, 2015.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury, v. 36, n.12, p. 1392–1404, 2005.

DIRCKX, N.; HUL, M. Van; MAES, C. Osteoblast Recruitment to Sites of Bone Formation in Skeletal Development, Homeostasis, and Regeneration. Birth Defects Res C Embryo Today, v.99, n. 3, p. 170–191, 2013.

DOMINICI M. et al. Minimal criteria for definig multipotente mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v. 8, n. 4, p.315-317, 2006.

EGUSA, H. et al. "Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing." J Biol Chem, v. 280, n. 25, p. 23691-7, 2005.

FERREIRA, M. L. et al. Modelo experimental em ratos para o desenvolvimento de pseudoartrose. Rev. Col. Bras. Cir, vol.36, n.6, pp.514-518, 2009.

GRANCHI, D. et al. Biological basis for the use of autologous bone marrow stromal cells in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia. Bone, v. 46, n.3, pp.

780-788, 2010.

GIULIANI, N. et al. New Insights into Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications for Bone Regeneration in Pediatric Orthopaedics. Stem Cells Int, v. 2013, 2013.

HEFTI, F. et al. Congenital pseudarthrosis of the tibia: History, etiology, classification, and epidemiologic. J Pediatr Orthop B, v.9, n. 1, p. 11-15, 2000.

HERMANNS-SACHWEH, B. et al. Vascular changes in the periosteum of congenital pseudarthrosis of the tibia. Pathol Res Pract, v. 201, n. 4, p. 305–312, 2005.

IPPOLITO E. et al. Pathology of bone lesions associated with congenital pseudarthrosis of the leg. J Pediatr Orthop, v. 9, pp. 3-10, 2000.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodeling. Eur J Cancer Care, 2017.

KINI U, NANDEESH B.N. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: Fogelman I, editor. Radionuclide and hybrid bone imaging. Berlin/Heidelberg: Springer; p. 29–57, 2012. LEE, D. Y. et al. Disturbed osteoblastic differentiation of fibrous hamartoma cell from congenital pseudarthrosis of the tibia associated with neurofibromatosis type I. Clin Orthop Surg, v. 3, n. 3, p. 230–237, 2011.

LEE, S. M. et al. Is double inactivation of the Nf1 gene responsible for the development of congenital pseudarthrosis of the tibia associated with NF1? J Orthop Res, v. 30, n. 10, p. 1535–1540, 2012.

LELEI, L. K. Congenital pseudoarthrosis of the clavicle: Case report. East Afr Med J, v. 82, n. 5, p. 270–272, 2005.

LESKELA, H.V. et al. Congenital pseudarthrosis of neurofibromatosis type 1: impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression. Bone, v.44, pp. 243-250, 2009.

MARIAUD-SCHMIDT, R. P. et al. Hamartoma involving the pseudarthrosis site in patients with neurofibromatosis type 1. Pediatr Dev Pathol, v. 8, n. 2, p. 190–196, 2005.

MEIRELLES LDA, S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev, v. 20, n. 5-6, p. 419-27, 2009.

MUKHOPADHAYA, J.; SHIVAPURI, S. Congenital pseudarthrosis of radius. A case report. Strategies Trauma Limb Reconstr, v. 1, n. 1, p. 51–54, 2006.

NAKASHIMA, K.; DE CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. Trends Genet, v. 19, n. 8, p. 458–466, 2003.

PANNIER, S. Congenital pseudarthrosis of the tibia. Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research, v. 97, n. 7, p. 750–761, 2011.

PATWA, J.; PATEL, R. A short series of congenital pseudoarthrosis tibia. J Orthop, v. 10, n. 3, p. 123–132, 2013.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.

RAMELLI, G. P. et al. Congenital pseudarthrosis of the ulna and radius in two cases of neurofibromatosis type 1. Pediatr Surg Int, v. 17, n. 2–3, p. 239–241, 2001.

TSAI, M. S. et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod,v. 19, n.6, p.1450-6, 2004.

TIKKANEN, J. et al. Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation. Cytotherapy, v.12, n.5, p.593-604, 2010.

SAKAMOTO, A. et al. Congenital pseudarthrosis of the tibia: Analysis of the histology and the NF1 gene. J Orthop Sci, v. 12, n. 4, p. 361–365, 2007.

SHADI, M. KOCZEWSK, P. Complex treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia with periosteal grafting and intramedullary fixation. Postępy Nauk Medycznych, n. 6, p. 523–529, 2012.

SHAPIRO. Bone development and its relation to fracture repair. The role of 50

mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater, v. 15, p. 53-76, 2008.

VAN PHAM, P. et al. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. Cell Tissue Bank, v. 17, n. 2, p. 289–302, 2016.

WANG, H.-S. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. Stem Cells, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 2004.

ZVAIFLER, N. J. et al. "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res, v. 2, n. 6, p. 477-88, 2000.