UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RAFAELA ROSSETTI

**Caracterização *in vivo* de células-tronco mesenquimais
murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à
capacidade de geração de nicho hematopoético
heterotópico**

Ribeirão Preto

2020

RAFAELA ROSSETTI

Caracterização *in vivo* de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à capacidade de geração de nicho hematopoético heterotópico

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular
Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto
2020

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.

Rossetti, Rafaela

Caracterização *in vivo* de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à capacidade de geração de nicho hematopoético heterotópico, 2020.

98 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Covas, Dimas Tadeu

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Nicho hematopoético heterotópico. 3. Medula óssea. 4. Osso compacto.

Nome: ROSSETTI, Rafaela

Título: Caracterização *in vivo* de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à capacidade de geração de nicho hematopoético heterotópico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Membro do programa

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro da USP

Instituição: – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro externo à USP

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Arilda e minha avó Neuza.
Este trabalho de mestrado representa, além de um título acadêmico, a vitória de
duas mulheres fortes na criação de uma menina. Vocês me ensinam a todo
momento a viver com fé, garra e dignidade.
Obrigada por tudo. São meus grandes exemplos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me abençoar e me guiar até onde estou hoje.

À minha mãe Arilda e minha avó Neuza, por toda dedicação, amor e companheirismo dedicados a mim. Obrigada por acreditarem em mim e me fortalecerem sempre. Nós três sempre estaremos juntas.

À minha família, que me apoiam e se orgulham das minhas conquistas.

Ao prof. Dr. Dimas Tadeu Covas por me permitir fazer parte desta maravilhosa equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto, por todas as oportunidades e pela orientação dada.

À Profa. Dra. Simone Kashima por me ajudar a me desenvolver como pesquisadora.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, por toda troca de experiência científica e momentos agradáveis compartilhados.

Aos companheiros do Laboratório de Transferência Gênica, pela amizade desde o início da minha trajetória no Hemocentro. Em especial, Daianne e Lucas.

Aos meus parceiros de bancada, Juliana, Felipe, Fernanda e Péricles, que me ajudaram na realização dos experimentos e se mostraram disponíveis para colaborar com meu projeto de mestrado.

Aos integrantes dos laboratórios de Citometria de Fluxo, de Imunohistoquímica e de Estudos em Experimentação em Animais pela contribuição nos experimentos.

Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável.

À Dalvinha, por toda ajuda com a parte burocrática e por se tornar uma amiga tão especial para mim e minha família, sempre compartilhando conosco sua sabedoria de vida.

À Rosana e Silvia, pela ajuda com as questões sobre o programa de pós-graduação.

À Sandra, pela ajuda com elaboração das imagens.

Aos parceiros da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela contribuição científica e compartilhamento de materiais.

Aos meus amigos, em especial aos da graduação em Ciências Biológicas pela FFCLRP e todos demais que a USP me apresentou, por fazerem toda a jornada ser mais divertida.

À Clínica veterinária “Nucleon Vet” pelos serviços prestados com muito carinho.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular pela contribuição científica e acadêmica.

À FAPESP - processo: 2017/12663-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP), CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Aos membros da banca pela disponibilização e contribuição para melhoria deste trabalho.

RESUMO

ROSSETTI, Rafaela. **Caracterização *in vivo* de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à capacidade de geração de nicho hematopoético heterotópico.** 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O nicho hematopoético é o microambiente composto por diferentes tipos celulares e estímulos que regulam a autorrenovação, diferenciação e proliferação das células-tronco hematopoéticas. As células-tronco mesenquimais (CTMs) são importantes componentes do nicho hematopoético. As CTMs foram inicialmente estudadas a partir da medula óssea, sabe-se que são capazes de formar colônias quando cultivadas e de se diferenciarem dando origem às células dos tecidos adiposo, ósseo e cartilaginoso, bem como de originar nicho hematopoético heterotópico após implantadas. Essas células foram inicialmente descritas com localização perivascular na medula óssea, porém estudos posteriores demonstraram que as CTMs também estão presentes na região do endóstio. Então, foi sugerida a hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs na medula óssea, sendo uma de localização endosteal, responsável principalmente pela geração dos tecidos esqueléticos durante a fase de desenvolvimento e pela homeostase do tecido e outra, de localização perivascular, que atuaria no reparo tecidual durante a fase adulta. Assim, nesse trabalho, CTMs isoladas da medula óssea (MO-CTMs) e do osso compacto (OC-CTMs) de camundongos da linhagem C57BL/6^{GFP} foram comparadas quanto às suas características *in vitro* e capacidade de originar um nicho hematopoético heterotópico. Foi observado que as CTMs apresentaram diferenças com relação à frequência de CFU-F, perfil imunofenotípico, capacidade de diferenciação e expressão gênica. Adicionalmente, a avaliação de três diferentes protocolos para a padronização do implante de CTMs, visando formação de nicho hematopoético, mostrou que o implante de Matrigel com grânulos de hidroxiapatita, células endoteliais e OC-CTMs foi capaz de proporcionar a geração de um nicho hematopoético heterotópico.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Nicho hematopoético heterotópico. Medula óssea. Osso compacto.

ABSTRACT

ROSSETTI, Rafaela. ***In vivo* characterization of murine mesenchymal stem cells from bone marrow and compact bone in relation to its heterotopic hematopoietic niche generation potential**. 2020. 98 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The hematopoietic stem cell niche is the microenvironment composed of different types of cells and stimulus that regulate self-renewing, differentiation and proliferation of the hematopoietic stem cells. The mesenchymal stem cells (MSCs) are important components of the hematopoietic niche. The MSCs were previously studied from bone marrow, it's known that, in culture, they are able to form colonies and differentiate giving rise to cells of adipose, bone and cartilaginous tissue, as well as originate heterotopic hematopoietic niche when implanted. These cells were initially described with perivascular location in the bone marrow, although later studies have shown that the MSCs are also present in the endosteum region. So, it's been suggested the hypothesis of existing two distinct populations of MSCs in the bone marrow, one located in the endosteum region, being mainly responsible for generating bone tissues during the development phase and for tissue homeostasis, and another, of perivascular location, which would act in tissue repair during adulthood. Therefore, in this work, MSCs isolated from bone marrow (BM-MSCs) and compact bone (CB-MSCs) from C57BL/6^{gfp} mice were compared to their *in vitro* characteristics and their capacity to originate a heterotopic hematopoietic niche. It's been observed that the MSCs have shown differences related to their frequency of CFU-F, immunophenotypic profile, capacity of differentiation and gene expression. Additionally, the evaluation of three different protocols to standardize MSCs implantation, aiming the hematopoietic niche formation, has shown that implantation of Matrigel along with hydroxyapatite granules, endosteum cells and BM-MSCs were able to provide the generation of a heterotopic hematopoietic niche.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Heterotopic hematopoietic niche. Bone marrow. Compact bone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs na medula óssea	24
Figura 2: Estratégia experimental.....	33
Figura 3: Protocolos de implante.....	43
Figura 4: Número total de células isoladas a partir da medula óssea e do osso compacto.....	48
Figura 5: Potencial clonogênico das CTMs	49
Figura 6: Frequência de CFU-F obtida com o isolamento das células da medula óssea e do osso compacto	50
Figura 7: Morfologia fibroblastóide das CTMs	51
Figura 8: Perfil imunofenotípico das CTMs.....	53
Figura 9: Capacidade de diferenciação adipogênica das CTMs	54
Figura 10: Comparação da diferenciação adipogênica das CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O ₂) e normóxia (21% O ₂).....	55
Figura 11: Capacidade de diferenciação osteogênica das CTMs	57
Figura 12: Quantificação da diferenciação osteogênica	58
Figura 13: Comparação da diferenciação osteogênica das MO-CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O ₂) e normóxia (21% O ₂).....	58
Figura 14: Comparação da diferenciação osteogênica das OC-CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O ₂) e normóxia (21% O ₂).....	59
Figura 15: Potencial proliferativo das CTMs.....	60
Figura 16: Potencial proliferativo das CTMs isoladas de diferentes animais durante cultivo em condição de hipóxia (5% O ₂) e normóxia (21% O ₂).....	61
Figura 17: Perfil de expressão gênica das CTMs após 7 dias de cultivo em hipóxia (5% O ₂) e normóxia (21% O ₂)	62
Figura 18: Aderência das células ao biomaterial.....	63
Figura 19: Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 1	64
Figura 20: Histologia dos organoides obtidos com o protocolo de implante 1 corados com hematoxilina e eosina.....	65
Figura 21: Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 2	66

Figura 22: Exame radiológico dos animais implantados com o protocolo 2 realizado após 63 dias	67
Figura 23: Animais no momento da retirada dos organoides obtidos com o protocolo de implante 2.....	68
Figura 24: Organoides obtidos após 74 dias do implante com o protocolo 2	69
Figura 25: Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 2 corados com hematoxilina e eosina	70
Figura 26: Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 2 corados com tricômico de Masson.....	71
Figura 27: Análise com imunohistoquímica dos organoides formados após o implante com o protocolo 2.....	72
Figura 28: Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 3	73
Figura 29: Exame radiológico dos animais implantados com o protocolo 3 realizado após 29 dias.	74
Figura 30: Animais no momento da retirada dos organoides obtidos com o protocolo de implante 3.....	75
Figura 31: Organoides obtidos após 76 dias do implante com o protocolo 3	76
Figura 32: Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 3 corados com hematoxilina e eosina	77
Figura 33: Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 3 corados com tricômico de Masson.....	78
Figura 34: Análise com imunohistoquímica dos organoides formados após o implante com o protocolo 3.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos organoides formados 57 dias após o implante realizado com o protocolo 1.....	64
Tabela 2: Tamanho dos organoides formados 74 dias após o implante realizado com o protocolo 2.....	68
Tabela 3: Tamanho dos organoides formados 76 dias após o implante realizado com o protocolo 3.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	β -actina
ALCAM	Do inglês, <i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i> (molécula de adesão de leucócito ativado)
APC	Do inglês, <i>allophycocyanin</i> (aloficocianina)
BMP	Do inglês, <i>bone morphogenetic protein</i> (proteína morfogenética óssea)
BSA	Do inglês, <i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
Ct	Do inglês, <i>cycle threshold</i>
CTHs	Células-tronco hematopoéticas
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CFU-F	Do inglês, <i>colony forming units-fibroblastic</i> (unidades formadoras de colônias fibroblásticas)
CXCL12	Do inglês, <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> (quimiocina CXC ligante 12)
CXCL4	Do inglês, <i>C-X-C motif chemokine ligand 4</i> (quimiocina CXC ligante 4)
CXCR4	Do inglês, <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (receptor de quimiocina do tipo 4)
DAB	Diaminobenzidina
DLX6	Do inglês, <i>distal-Less homeobox 6</i>
DO	Densidade óptica
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
GAPDH	Do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
Grem-1	<i>Gremlin-1</i>
GFP	Do inglês, <i>green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
HA	Hidroxiapatita
HIF	Do inglês, <i>hypoxia-inducible factors</i> (fatores de transcrição induzíveis por hipóxia)
HMVEC	Do inglês, <i>human lung microvascular endothelial cells</i> (células endoteliais humanas da microvasculatura do pulmão)

HUVEC	Do inglês, <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (células endoteliais da veia do cordão umbilical humano)
MO-CTMs	Células-tronco mesenquimais da medula óssea
NSG	NOD scid gamma
OC-CTMs	Células-tronco mesenquimais do osso compacto
PBS	Do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
PDGFR α	Do inglês, <i>platelet-derived growth factor receptor α</i> (receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas)
PE	Do inglês, <i>phycoeritrin</i> (ficoeritrina)
RUNX2	Do inglês, <i>Runt related transcription factor 2</i> (fator de transcrição relacionado à Runt 2)
RPM	Rotações por minuto
Sca-1	Do inglês, <i>stem cells antigen-1</i> (antígeno 1 de células-tronco)
SCF	Do inglês, <i>stem cells factor</i> (fator de células-tronco)
SFB	Soro fetal bovino
SPP1	Do inglês, <i>secreted phosphoprotein 1</i> (fosfoproteína 1 secretada)
TA	Temperatura ambiente
TBS	Do inglês, <i>tris buffered saline</i> (tampão tris salino)
TBS-t	Do inglês, <i>tris buffered saline tween</i> (tampão tris salino <i>tween</i>)
URE	Unidades relativas de expressão
VCAM1	Do inglês, <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula 1 de adesão celular vascular)

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	17
1.1.	Nicho hematopoético.....	17
1.2.	Células-tronco mesenquimais	20
1.3.	Bioengenharia para a geração de nicho hematopoético heterotópico.....	24
2.	Objetivos	30
2.1.	Objetivo geral	30
2.2.	Objetivos específicos	30
3.	Material e métodos	33
3.1.	Estratégia experimental.....	33
3.2.	Aspectos éticos e biossegurança	33
3.3.	Animais.....	33
3.4.	Isolamento das células-tronco mesenquimais.....	34
3.5.	Cultivo das células-tronco mesenquimais	35
3.6.	Avaliação da frequência de CFU-F e morfologia.....	35
3.7.	Análise do perfil imunofenotípico.....	36
3.8.	Indução da diferenciação adipogênica e osteogênica <i>in vitro</i>	36
3.9.	Avaliação da proliferação celular.....	38
3.10.	Análise do perfil de expressão gênica	38
3.11.	Avaliação da aderência das células ao biomaterial.....	39
3.12.	Estabelecimento do protocolo para adição das células ao biomaterial e implante em camundongos	40
3.12.1.	Protocolo de implante 1	40
3.12.2.	Protocolo de implante 2.....	41
3.12.3.	Protocolo de implante 3.....	42
3.13.	Retirada do tecido formado no local do implante	44
3.14.	Análise do tecido formado no local do implante	44
3.15.	Coloração com hematoxilina e eosina.....	44
3.16.	Coloração com tricômico de Masson	45
3.17.	Análise por imunohistoquímica.....	45
3.18.	Análises estatísticas	46
4.	Resultados	48
4.1.	Isolamento de células da medula óssea e do osso compacto.....	48
4.2.	Potencial clonogênico	48

4.3.	Morfologia.....	50
4.4.	Perfil imunofenotípico.....	52
4.5.	Capacidade de diferenciação <i>in vitro</i>	54
4.6.	Proliferação celular.....	59
4.7.	Perfil de expressão gênica	61
4.8.	Adesão das células ao biomaterial	63
4.9.	Organoide formado após o implante	63
4.9.1.	Protocolo de implante 1	63
4.9.2.	Protocolo de implante 2.....	65
4.9.3.	Protocolo de implante 3.....	73
5.	Discussão	80
6.	Conclusões	89
7.	Referências Bibliográficas	91

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nicho hematopoético

O nicho hematopoético consiste no microambiente formado por componentes celulares e estímulos que regulam a autorrenovação, diferenciação e proliferação das células-tronco hematopoéticas (CTHs), as quais são responsáveis pela geração das células do sangue durante toda a vida do indivíduo. A hipótese da existência do nicho hematopoético foi inicialmente proposta por Schofield em 1978 e sugere que as CTHs existem em associação com outros tipos celulares, os quais provém suporte físico e sinais bioquímicos que regulam a biologia das CTHs. Assim, mesmo as CTHs apresentando a capacidade de autorrenovação, acredita-se que seja necessário o contato com os componentes do nicho hematopoético para que se determine o seu estado de diferenciação, número e persistência (SCHOFIELD, 1978).

A partir da hipótese da existência do nicho hematopoético despertou-se o interesse em conhecer e descrever os tipos celulares que contribuem para a sua manutenção e os mecanismos envolvidos na regulação das CTHs, os quais ainda não foram totalmente elucidados (revisado em BOULAIS; FRENETTE, 2015). Dentre as células que compõem este microambiente, as mais extensivamente estudadas são as células da linhagem osteogênica, as células endoteliais e as células-tronco mesenquimais (CTMs). Adicionalmente, outros tipos celulares presentes no microambiente medular contribuem para a regulação das CTHs, dentre eles macrófagos, megacariócitos, adipócitos e células do sistema nervoso periférico (revisado em ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017; CRANE; JEFFERY; MORRISON, 2017).

Diferentes fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas proporcionam a manutenção do nicho hematopoético e dentre eles encontram-se o fator de células-tronco (SCF, do inglês *stem cells factor*) e a quimiocina CXC ligante 12 (CXCL12, do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 12*). O SCF é ligante do receptor KIT e apresenta importante papel na hematopoese. Já foi observado que sua deleção ocasionou redução do número de células formadoras de colônias e sua ativação foi necessária para a reconstituição da hematopoese e para a migração e adesão das CTHs às células endoteliais e estromais, demais componentes do nicho hematopoético (KIMURA *et al.*, 2011). O CXCL12, por sua vez, liga-se ao receptor de quimiocina do tipo 4 (CXCR4, do inglês *C-X-C chemokine receptor type 4*), é produzido

principalmente por células reticulares (SUGIYAMA *et al.*, 2006) e regula o tráfego das CTHs na medula óssea (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2008). Dessa forma, as células do nicho hematopoético são responsáveis pela secreção dessas e de outras moléculas as quais são cruciais para a regulação das CTHs.

Os osteoblastos são células da linhagem osteogênica localizadas principalmente na superfície interna do osso, chamada de endóstio. Já foi observado, por meio de experimentos *in vivo*, que o aumento no número de osteoblastos está relacionado com o aumento na quantidade de CTHs e que o controle do número de CTHs se dá por meio da sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP, do inglês *bone morphogenetic protein*) (ZHANG *et al.*, 2003).

O endóstio é uma região de grande importância para o nicho hematopoético, altamente vascularizado e apresenta uma heterogeneidade celular, sendo composto por células que desempenham diferentes funções. Dentre as células encontradas no endóstio estão células de linhagem osteogênica em diferentes níveis de diferenciação, CTHs e CTMs. Um estudo sobre as células presentes na região do endóstio, demonstrou a presença de três subpopulações celulares diferentes com base na expressão da molécula de adesão de leucócito ativado (ALCAM) e do antígeno 1 de células-tronco (Sca-1), as quais sugere-se contribuir para a regulação das CTHs na medula óssea (NAKAMURA *et al.*, 2010).

As células endoteliais, por sua vez, contribuem para a expansão das CTHs, dão suporte à sua autorrenovação e evitam sua exaustão (BUTLER *et al.*, 2010). Alguns dos mecanismos envolvidos na regulação das CTHs pelas células endoteliais incluem a secreção de SCF (DING *et al.*, 2012) e CXCL12 (DING; MORRISON, 2013), de modo que a deleção desses fatores promove a diminuição no número de CTHs. Também foi visto que a molécula de adesão E-selectina, expressa pelas células endoteliais na medula óssea, desempenha um papel no nicho hematopoético, uma vez que seu nocaute experimental causou um aumento no número de CTHs quiescentes e na sua capacidade de autorrenovação (WINKLER *et al.*, 2012).

Diferenças na permeabilidade dos vasos e na concentração de oxigênio observadas em sinusóides e artérias podem influenciar no estágio de diferenciação das CTHs (revisado em ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017). CTHs localizadas próximas às artérias, que são vasos sanguíneos com menor permeabilidade ao oxigênio e, portanto, possuem ambiente circunjacente mais hipóxico, encontram-se em estado de quiescência. Por outro lado, CTHs associadas aos sinusóides, com

maior permeabilidade ao oxigênio, possuem maior capacidade de diferenciação (ITKIN *et al.*, 2016). No entanto, novos achados podem contribuir para uma melhor compreensão da relação entre os tipos de vasos sanguíneos e o estágio de diferenciação das CTHs, visto que essa relação ainda não é bem definida e diferentes estudos já apresentaram resultados contraditórios (revisado em CRANE; JEFFERY; MORRISON, 2017).

A concentração de oxigênio pode influenciar também o comportamento das CTMs presentes no nicho hematopoético e a hematopoese, visto que CTMs da medula óssea apresentaram maiores capacidade de proliferação e potencial clonogênico em condições de hipóxia *ex vivo* (GUARNERIO *et al.*, 2014) e a expressão de fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible transcription factors*) mostrou-se relevante para regulação da hematopoese (revisado em MOHYELDIN; GARZÓN-MUVDI; QUIÑONES-HINOJOSA, 2010; SUDA; TAKUBO; SEMENZA, 2011; GUARNERIO *et al.*, 2014).

Outras células também são descritas como contribuintes para a manutenção e regulação do nicho hematopoético. A depleção de macrófagos na medula óssea em experimentos *in vivo* resultou na mobilização de progenitores hematopoéticos para a corrente sanguínea (CHOW *et al.*, 2011). Adicionalmente, os megacariócitos podem contribuir para a manutenção da quiescência das CTHs, visto que produzem a quimiocina CXC ligante 4 (CXCL4, do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 4*), que está relacionado com o ciclo celular das CTHs (BRUNS *et al.*, 2014). Os adipócitos já foram apontados como possíveis reguladores negativos da medula óssea, pois em animais irradiados houve enxerto da medula óssea mais rápido quando foi feito bloqueio da adipogênese (NAVEIRAS *et al.*, 2009). Em conjunto, esses dados reforçam que diversas células e moléculas estão envolvidas em uma complexa regulação das CTHs no microambiente medular.

As CTMs também são importantes componentes do nicho hematopoético, pois desempenham um papel essencial na gênese do microambiente da medula óssea, liberam fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que influenciam o comportamento das CTHs e dão origem a outros tipos celulares que estão presentes na medula óssea. Por ser o foco deste trabalho, a biologia das CTMs será abordada em maior detalhe a seguir.

1.2. Células-tronco mesenquimais

As CTMs são células com capacidade de autorrenovação e potencial multipotente, podendo dar origem a células dos tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso. Um dos trabalhos pioneiros no estudo dessas células foi o realizado por Tavassoli e Crosby em 1968, que demonstrou que células reticulares e não hematopoéticas presentes na medula óssea foram capazes de originar um ossículo ectópico e dar suporte a hematopoese após serem transplantadas (TAVASSOLI; CROSBY, 1968). Esses resultados sugeriram a existência de outra população de células-tronco na medula óssea, além das CTHs.

Então, poucos anos depois, foi identificada a população de células estromais com potencial de diferenciação osteogênica presente na medula óssea. Foi observado que com o isolamento e cultivo dessas células eram obtidas colônias fibroblastóides, que aumentavam em tamanho com o passar dos dias de cultivo celular. Adicionalmente, foi sugerido que cada colônia poderia ter sido originada de uma única célula, representando um clone celular (FRIEDENSTEIN, 1970).

Devido a capacidade de formar colônias de células fibroblastóides, essas células foram inicialmente denominadas “unidades formadoras de colônias fibroblásticas” (CFU-F, do inglês *colony forming units-fibroblastic*). Com o passar dos anos e uma melhor compreensão a respeito dessas células, outras denominações foram sugeridas, como “células-tronco estromais da medula óssea” devido a sua capacidade de formar diferentes tipos de tecido conjuntivo (FRIEDENSTEIN, 1990) e “células-tronco mesenquimais”, por serem consideradas as precursoras das linhagens celulares mesenquimais do organismo (CAPLAN, 1991). Atualmente, há um questionamento quanto ao uso do termo “células-tronco mesenquimais”, uma vez que para sua utilização deve-se comprovar *in vitro* e *in vivo* a capacidade de diferenciação dessas células. Porém, essa terminologia ainda é amplamente encontrada na literatura e, portanto, foi adotada neste trabalho.

Além do potencial clonogênico, as CTMs também são caracterizadas pela aderência ao plástico em condições de cultivo, expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, não expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD7 α ou CD19 e HLA-DR e capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. Tais características foram adotadas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular como critérios para a classificação de uma célula

como CTM, na tentativa de padronização diante da diversidade de estudos e metodologias envolvendo essas células (DOMINICI *et al.*, 2006).

No caso específico das CTMs isoladas de murinos, não há um perfil de marcadores de superfície definido. No entanto, com o avanço nos estudos das CTMs utilizando modelos animais, determinados marcadores vêm sendo comumente usados para a caracterização dessa população celular. Por exemplo, foi demonstrado que a população de CTMs murinas positivas para o receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α) e para Sca-1 apresentou maior potencial clonogênico dentre as populações celulares estudadas e foi capaz de se diferenciar e dar suporte à hematopoese *in vivo* (MORIKAWA *et al.*, 2009). De modo geral, dentre os marcadores de superfície convencionalmente utilizados para a caracterização de CTMs murinas encontram-se Sca-1, CD44, CD29, CD90 (MEIRELLES; NARDI, 2003; NADRI *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2010). E, assim como estabelecido para as CTMs humanas, espera-se a não expressão de marcadores típicos de células hematopoéticas, como CD45.

Como mencionado anteriormente, as primeiras CTMs descritas foram obtidas da medula óssea, assim são as mais conhecidas e bem caracterizadas até hoje. Porém, essas células já foram isoladas de diversos tecidos, como adiposo, cordão umbilical e polpa dentária e foram relatadas diferenças entre CTMs de diferentes fontes, com relação à proliferação, capacidade de diferenciação e expressão gênica (WAGNER *et al.*, 2005; BAKSH; YAO; TUAN, 2007).

As CTMs despertam grande interesse na comunidade científica desde sua descoberta, principalmente devido a possibilidade de seu uso na terapia celular e medicina regenerativa. Nos últimos anos, o número de ensaios clínicos utilizando CTMs têm aumentado consideravelmente (revisado em WEI *et al.*, 2013). A sua possível utilização como forma de terapia deve-se a sua capacidade de diferenciação e ao seu efeito parácrino, que possibilita influenciar outras células a partir do seu produto secretado (revisado em MEIRELLES *et al.*, 2009). Adicionalmente, sabe-se que as CTMs são atraídas para locais de lesão, devido a sua propriedade denominada *homing*, de modo que quando implantadas podem migrar preferencialmente para essas regiões específicas e atuar na sua regeneração (revisado em MEIRELLES *et al.*, 2009).

Sendo assim, já foi observado, por exemplo, que o implante de CTMs contribui para o processo de regeneração do tecido ósseo (BRUDER *et al.*, 1998; revisado em

KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006; KIM *et al.*, 2007) e que as vesículas extracelulares liberadas por essas células também são capazes de promover a regeneração óssea (QIN *et al.*, 2016), reforçando a possibilidade do uso das CTMs na medicina regenerativa. No entanto, apesar de avanços e resultados promissores no uso das CTMs na terapia celular, ainda há obstáculos que dificultam sua ampla utilização, como a falta de conhecimento do modo de atuação específico dessas células, questionamentos sobre a fonte adequada para cada tipo de tratamento e possíveis contraindicações (revisado em WEI, *et al.*, 2013).

Assim, embora tenha ocorrido um intenso interesse em conhecer melhor as propriedades das CTMs devido ao seu potencial uso na terapia celular, que levou à uma diversidade de estudos de caracterização *in vitro* dessas células, inicialmente pouco se sabia a respeito da sua localização e funcionalidade no organismo. É importante considerar que características das células observadas durante o seu cultivo podem não ser as mesmas apresentadas em seu ambiente nativo *in vivo*, uma vez que as condições de cultivo alteram o fenótipo celular. Além disso, conhecer a localização nativa das CTMs pode contribuir para uma melhor compreensão da sua função no microambiente em que ocorre.

Os primeiros estudos com relação à localização das CTMs no seu tecido de origem sugeriram que estas estariam presentes na região perivascular, uma vez que foi observado que CTMs da medula óssea estavam presentes na microvasculatura do tecido (SHI; GRONTHOS, 2003) e compartilhavam características com pericitos com relação à morfologia, expressão de marcadores de superfície e capacidade de diferenciação (COVAS *et al.*, 2008). Assim, durante muito tempo a ideia de uma localização perivascular para as CTMs da medula óssea foi amplamente aceita, até que novos trabalhos demonstraram que essas células também estavam presentes na região do endósteo (TORMIN *et al.*, 2011).

Recentemente, por meio de metodologias mais refinadas, foi reforçada a ideia da presença de CTMs nas regiões perivascular e endosteal da medula óssea. Foi observado que CTMs positivas para *Gremlin-1* (Grem-1), presentes principalmente no mesênquima e na região esponjosa do fêmur, não expressavam nestina (WORTHLEY *et al.*, 2015). Esse achado contraria estudos anteriores que relataram a expressão de nestina pelas CTMs da medula óssea (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2010). Também foi visto que as CTMs *Grem-1*⁺ apresentaram maior potencial clonogênico quando comparadas com as CTMs positivas para nestina. Além disso, os clones das CTMs

Grem-1⁺ foram capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e miofibroblastos, mas não deram origem a adipócitos, tanto nos experimentos *in vitro* como *in vivo*. Então, mais uma vez, os resultados obtidos nesse trabalho contrariam características previamente descritas para as CTMs (CRISAN *et al.*, 2008). E, ao se questionarem sobre a possibilidade das duas populações de CTMs em questão representarem uma mesma célula em estados de diferenciação distintos, foi observado que clones *Grem-1*⁺ não deram origem a células positivas para nestina após cultivadas ou em testes *in vivo* (WORTHLEY *et al.*, 2015).

Outro estudo importante publicado no mesmo período demonstrou que progenitores clonais na medula óssea localizados na região da placa de crescimento originavam tecido ósseo, cartilagem e estroma, ao passo que não contribuíam para a formação de músculo e tecido adiposo. Também foi observado que subpopulações de células progenitoras esqueléticas com diferenças na expressão de marcadores de superfície apresentaram diferentes capacidades de diferenciação, sendo sugerido uma hierarquia entre elas, onde apenas a subpopulação de células CD45⁻TER119⁻Tie2⁻AlphaV⁺Thy6C3⁻CD105⁻CD200⁺ teria o potencial de dar origem a todas as outras subpopulações estudadas (CHAN *et al.*, 2015).

Assim, a fim de conciliar esses novos achados com os estudos anteriores, foi elaborada a hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs na medula óssea. Essas populações seriam diferentes principalmente com relação à fase de vida do indivíduo em que atuariam e quanto à sua localização. Desse modo, uma das populações seria composta por CTMs presentes no endóstio que atuariam principalmente na geração e homeostase dos tecidos esqueléticos durante a fase de desenvolvimento do indivíduo. Enquanto a outra população seria formada por CTMs de localização perivascular da medula óssea, que seriam capazes de se diferenciar em adipócitos e atuariam no reparo tecidual durante a fase adulta (**figura 1**) (WORTHLEY *et al.*, 2015; KASSEM; BIANCO, 2015).

Dessa forma, considerando a hipótese da existência de populações de CTMs com características distintas localizadas nas regiões perivascular e endosteal da medula óssea, esse trabalho visou a comparação entre CTMs murinas isoladas da medula óssea (MO-CTMs) e do osso compacto (OC-CTMs). As células foram caracterizadas *in vitro* com relação as características típicas das CTMs, avaliando-se o potencial clonogênico, morfologia, capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, perfil imunofenotípico, proliferação celular e expressão gênica, e como

ferramenta para a sua caracterização *in vivo* utilizamos a mimetização do nicho hematopoético por meio do implante subcutâneo em camundongos.

Figura 1. Hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs na medula óssea. As populações de CTMs seriam diferentes com relação à localização e ao período de vida do indivíduo de sua principal atuação. A população composta por CTMs presentes na região do endóstio, denominadas neste trabalho como OC-CTMs, teriam maior participação na geração e homeostase dos tecidos esqueléticos durante a fase de desenvolvimento e também atuariam na fase adulta. A população de CTMs presentes na região perivascular da medula óssea, aqui chamadas de MO-CTMs, atuariam no reparo tecidual durante a fase adulta. Essa hipótese foi sugerida por Worthley *et al.*, 2015 e Kassem; Bianco, 2015, e utilizada como base para este trabalho.

1.3. Bioengenharia para a geração de nicho hematopoético heterotópico

Uma das formas de compreender o nicho hematopoético, os seus componentes celulares e os seus mecanismos de regulação das CTHs é mimetizar este microambiente por meio da sua geração artificial. Já foram reportadas diversas técnicas para a geração do nicho hematopoético em ossículos heterotópicos, inclusive a partir do uso de CTMs da medula óssea. Uma vez estabelecido o nicho hematopoético heterotópico é possível manipulá-lo como desejável, realizando alterações em seus componentes celulares e fatores de crescimento, o que permite demonstrar a importância de cada um deles para a manutenção deste microambiente. Desta forma, a geração do nicho hematopoético heterotópico pode ser considerada uma ferramenta importante de estudo deste complexo microambiente.

A formação óssea heterotópica ou ectópica consiste no desenvolvimento de tecido ósseo fora do seu local de origem. Desse modo, ocorre em um ambiente desprovido ou reduzido de citocinas e células que atuam como estimuladores ósseos, o que pode representar um desafio para o estabelecimento do novo nicho hematopoético, mas, por outro lado, consiste em um modelo de estudo com menor quantidade de variáveis (revisado em SCOTT *et al.*, 2012).

Vários componentes estruturais, celulares e bioquímicos são importantes para a bioengenharia do nicho hematopoético, dentre eles será dado destaque às células utilizadas, ao biomaterial ou material de suporte implantado em conjunto com as células e ao uso de citocinas ou fatores de crescimento que contribuem para a diferenciação osteogênica.

Como descrito anteriormente, já se sabe desde os primeiros estudos que CTMs transplantadas em murinos são capazes de originar um microambiente medular dotado de atividade hematopoética em seu interior. Desse modo, essas células são amplamente usadas em modelos de formação de nicho hematopoético heterotópico. Comparações realizadas entre CTMs obtidas de diferentes fontes no organismo, sendo elas medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e pele mostraram que apesar de apresentarem morfologia, perfil imunofenotípico e capacidade de diferenciação *in vitro* semelhantes, as CTMs eram diferentes quanto ao potencial de formação de tecido medular *in vivo*, uma vez que apenas as CTMs da medula óssea foram capazes de originar ossículos e tecido hematopoético após serem implantadas (REINISCH *et al.*, 2015). A fim de potencializar a formação óssea, também são descritos protocolos nos quais as CTMs são previamente induzidas à diferenciação osteogênica *in vitro* e, então, implantadas no animal (HOLZAPFEL *et al.*, 2015).

Neste trabalho, analisamos dois processos importantes para a formação do microambiente medular, sendo eles a ossificação e a vascularização. É descrito que para a formação do nicho hematopoético é necessária a ossificação endocondral (CHAN *et al.*, 2009), a qual é encontrada na formação dos ossos longos em vertebrados e ocorre por uma etapa intermediária de formação de tecido cartilaginoso. A alteração do tecido cartilaginoso para o ósseo, que ocorre durante a ossificação endocondral, está relacionada com a invasão de vasos sanguíneos no tecido, demonstrando que a ossificação do microambiente medular está intimamente ligada à sua vascularização. Além disso, em seguida, os vasos sanguíneos contribuem para

a manutenção e crescimento dos ossos, por meio do fornecimento de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento (revisado em MAES, 2013).

Assim, diferentes estratégias são utilizadas na bioengenharia do nicho hematopoético na tentativa de garantir e potencializar o processo de vascularização, dentre elas o implante na cápsula renal e o uso de células endoteliais. A cápsula renal é uma região amplamente vascularizada e já foi demonstrada eficiente formação de nicho hematopoético heterotópico a partir do implante de células progenitoras nesse local (CHAN *et al.*, 2009; CHAN *et al.*, 2015; REINISCH *et al.*, 2015). Adicionalmente, o implante de células endoteliais em conjunto com as CTMs também mostrou favorecer o processo de vascularização nos organoides formados, evidenciado pela sua coloração avermelhada, e foi demonstrada a participação das células endoteliais humanas implantadas na neovascularização da estrutura óssea formada (PASSARO *et al.*, 2017).

Apesar do uso da cápsula renal como sítio de implante das células devido à ampla vascularização apresentada pelo órgão, os implantes comumente são subcutâneos, os quais representam uma técnica de execução mais simplificada e que também já demonstrou permitir sucesso na geração do microambiente medular (SACCHETTI *et al.*, 2007).

Além da relevância da escolha da célula adequada para o implante, a seleção do biomaterial ou material de suporte celular também é um importante aspecto para a formação do nicho hematopoético heterotópico. Os biomateriais são estruturas que podem ser sintetizadas visando mimetizar condições, morfologia ou elementos encontrados em determinado microambiente, podendo ser utilizados para cultivo das células *in vitro*, bem como para darem suporte para seu implante em experimentos *in vivo*. Além disso, podem ser obtidos a partir de processos naturais. Quando o ambiente a ser mimetizado é o nicho hematopoético, pode-se considerar materiais que reconstruam o sistema tridimensional poroso apresentado pelos ossos e/ou que apresentem importantes componentes desse tecido, como por exemplo a hidroxiapatita (HA).

Nesse contexto, já foi reportado o uso de osso derivado de fêmures humanos em experimentos *in vitro* a fim de se preservar a estrutura esponjosa do osso trabecular e tal sistema de cultura celular se demonstrou capaz de promover a autorrenovação *ex vivo* de CTHs (HUANG *et al.*, 2016). Adicionalmente, há uma diversidade de biomateriais tridimensionais e materiais gelatinosos utilizados para dar

suporte às células no implante subcutâneo que visa a formação de tecido ósseo. Dentre eles, encontram-se esponjas gelatinosas (PASSARO *et al.*, 2017), gel de fibrina (SACCHETTI *et al.*, 2007) e Matrigel (REINISCH *et al.*, 2015), sendo este último amplamente utilizado.

A HA e o tricálcio fosfato são osteoindutores comumente implantados em conjunto com as células e o material de suporte a fim de estimular a formação do tecido ósseo (SACCHETTI *et al.*, 2007). Dessa forma, diferentes associações entre os materiais de implante podem ser realizadas, o que reflete na diversidade de protocolos descritos. Por exemplo, o implante de CTMs em biomateriais contendo combinações de β - tricálcio fosfato e matrigel foi capaz de promover o recrutamento de células hematopoéticas para o local do implante (FERREIRA *et al.*, 2016).

A adição de BMP ao implante como estimulante para a formação do novo microambiente medular também é uma estratégia utilizada. Diversos estudos demonstraram a eficiência do uso de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 em diferentes protocolos de implante para a ossificação heterotópica (revisado em SCOTT *et al.*, 2012).

A utilização de osteoindutores ou estimuladores da osteogênese em conjunto com as células para induzir a formação do tecido ósseo pode ocorrer devido à falta de estímulos ósseos presentes no local do implante visto que, como mencionado anteriormente, trata-se de uma formação óssea heterotópica. Assim, podem representar uma sinalização para a diferenciação osteogênica das células implantadas e contribuir para a geração do nicho hematopoético heterotópico.

Resumindo, as CTMs são importantes constituintes do nicho hematopoético e apresentam a capacidade de originar um microambiente medular após serem implantadas. Adicionalmente, foi elaborada a hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs na medula óssea, uma de região perivascular e a outra endosteal. Sendo assim, considerando que a bioengenharia de nicho hematopoético heterotópico pode ser uma potente ferramenta para estudo dessas células, este trabalho visou a comparação entre CTMs murinas da medula óssea e do osso compacto quanto à capacidade de originar um nicho hematopoético heterotópico após implantadas em camundongos. Na tentativa de mantermos o cultivo celular mais fiel às condições encontradas no microambiente medular, as CTMs foram cultivadas em condições de hipóxia e, considerando a importância do processo de vascularização

para a obtenção do nicho hematopoético, células endoteliais foram implantadas em conjunto com as CTMs.

A geração do nicho hematopoético heterotópico por meio do implante de CTMs permite maior entendimento sobre a relevância dessas células para o estabelecimento e geração do nicho hematopoético. Adicionalmente, comparar CTMs de regiões distintas da medula óssea pode aumentar o conhecimento a respeito desse tipo celular e, assim, fornecer mais embasamento para o uso dessas células na terapia celular. A definição de populações de CTMs distintas na medula óssea e o conhecimento das suas particularidades podem contribuir para uma melhor seleção da população de CTMs mais adequada para cada tipo de terapia celular, de acordo com sua finalidade. Além disso, recapitular e entender o nicho hematopoético permite sua manipulação de maneira estratégica para um refinamento nos procedimentos terapêuticos com células-tronco da medula óssea.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar CTMs isoladas da medula óssea (MO-CTMs) e do osso compacto (OC-CTMs) de camundongos da linhagem C57BL/6^{GFP} baseado em suas características *in vitro* e na sua capacidade de originar um nicho hematopoético heterotópico.

2.2. Objetivos específicos

Meta 1: Isolamento e caracterização *in vitro* das CTMs

- Isolar MO-CTMs e OC-CTMs de camundongos transgênicos da linhagem C57BL/6^{GFP};
- Expandir as CTMs isoladas em condições de hipóxia (5% O₂);
- Caracterizar *in vitro* as CTMs com relação à morfologia, potencial clonogênico, capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, perfil imunofenotípico, proliferação celular e expressão gênica;
- Comparar a diferenciação adipogênica e osteogênica, proliferação celular e expressão gênica de CTMs com cultivo em condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (5% O₂);

Meta 2: Implante das CTMs para a formação do nicho hematopoético

- Estabelecer e caracterizar o cultivo das CTMs e células endoteliais no biomaterial;
- Avaliar a adesão das CTMs e das células endoteliais ao biomaterial;
- Realizar o implante subcutâneo das CTMs em camundongos imunodeficientes;
- Estabelecer um protocolo de implante subcutâneo de CTMs adequado para a formação de nicho hematopoético heterotópico utilizando biomaterial ou Matrigel®;
- Avaliar semanalmente o peso dos animais após a realização do implante até o momento de sua retirada;

Meta 3: Análise do organoide formado com o implante

- Avaliar a formação de tecido ósseo no local do implante pela realização de exames radiológicos;
- Retirar o organoide formado no local do implante;
- Realizar a análise macroscópica do organoide no momento de sua retirada;
- Caracterizar o organoide por análises histológicas e imunohistoquímica;

- Avaliar a formação de tecido ósseo, vascularização e geração de nicho hematopoético no tecido formado no local do implante;

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estratégia experimental

A estratégia experimental utilizada nesse trabalho de mestrado está esquematizada na **figura 2**. De modo geral, os experimentos foram divididos em três etapas, sendo a primeira referente ao isolamento, expansão e caracterização *in vitro* das CTMs; a segunda, ao implante das células em camundongos visando à formação do nicho hematopoético heterotópico, na qual foram avaliados três diferentes protocolos; e a terceira, à análise do organoide formado.

Figura 2. Estratégia experimental. Os experimentos realizados neste trabalho podem ser divididos em três etapas. A primeira baseou-se no isolamento e na caracterização *in vitro* das MO-CTMs e OC-CTMs com relação à morfologia, potencial clonogênico, perfil imunofenotípico, capacidade de diferenciação, proliferação celular e expressão gênica. A segunda etapa refere-se ao implante dessas células em camundongos, sendo avaliados três diferentes protocolos de implante. Na terceira etapa foi realizada a análise do organoide formado no local do implante, avaliando-se principalmente a vascularização do tecido, formação de tecido ósseo e geração de nicho hematopoético heterotópico.

3.2. Aspectos éticos e biossegurança

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) com o número de processo 287/2017.007-01 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA – FMRP – USP), registrado com o número 174/2017.

3.3. Animais

Os animais utilizados para o isolamento das CTMs foram camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6^{GFP} com 8 a 12 semanas de idade, os quais

eram geneticamente modificados para a expressão da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*). Os animais receptores dos implantes de células foram fêmeas da linhagem NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) com 8 a 14 semanas de idade. As matrizes das colônias de camundongos de ambas linhagens foram obtidas comercialmente através da empresa JAX mice.

Os animais foram mantidos no Laboratório para Estudos em Experimentação em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde o trabalho foi realizado, e foram transferidos para a sala de aclimação do LEEA no mínimo 3 dias antes da realização dos experimentos, a qual apresenta ciclo claro/escuro (12h/12h) e controle de temperatura (23 °C). Na sala de aclimação, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno devidamente autoclavadas de 30 cm x 20 cm x 13 cm, as quais eram acondicionadas em estantes ventiladas. Os animais tiveram acesso à água e ração autoclavadas *ad libitum*.

A eutanásia dos animais foi realizada com sobredose de ketamina e xilazina (300 e 30 mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal.

3.4. Isolamento das células-tronco mesenquimais

Para o isolamento das CTMs, fêmures e tíbias de camundongos machos da linhagem C57BL/6^{GFP} foram obtidos cirurgicamente com material estéril. Os ossos removidos foram reservados em tampão de coleta (solução salina tamponada com fosfato [PBS] com 2% de soro fetal bovino [SFB] e 1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético [EDTA]) e foi realizado o *flushing* da medula óssea utilizando o mesmo tampão. A medula óssea coletada foi utilizada para o isolamento das MO-CTMs. Após a remoção da medula óssea, os ossos foram macerados com o auxílio de pistilo e cadinho estéreis e tampão de coleta para o isolamento das OC-CTMs.

A medula óssea armazenada foi centrifugada a 1200 x *g* durante 5 minutos a 20°C e as células foram ressuspensas em tampão ACK de *lise* dos eritrócitos (solução com 155 mM de NH₄Cl, 7,2 mM de K₂CO₃ e 0,1 mM de EDTA) por 5 minutos em gelo. Então, foi adicionado meio α -MEM suplementado com 15% em volume de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e realizada uma nova centrifugação com as mesmas condições da anterior. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS 1x, foi realizada a contagem das células viáveis utilizando-se Azul de Trypan e o seu plaqueamento.

Os ossos compactos macerados foram centrifugados a $1200 \times g$ durante 5 minutos a 20°C e incubados durante 1 hora em tampão de digestão (solução de meio RPMI com 20% de SFB e 0,25% de collagenase tipo IA) a 37°C , sendo agitados a cada 20 minutos. Após a incubação, foi adicionado meio α -MEM com 15% SFB e 1% penicilina/estreptomicina, a solução foi filtrada em filtro de $100 \mu\text{m}$ e, em seguida, de $45 \mu\text{m}$ e foi realizada uma nova centrifugação com as mesmas condições da anterior. Assim como descrito para as células da medula óssea, foi realizada a *lise* com tampão ACK e a contagem das células viáveis com Azul de Trypan para o seu plaqueamento.

3.5. Cultivo das células-tronco mesenquimais

As células isoladas foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm^2 (células da medula óssea: $2,4 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^6$ células/ cm^2 ; células do osso compacto: $1,1 \times 10^4$ - 4×10^3 células/ cm^2) e cultivadas em estufa a 37°C com 5% CO_2 e 5% O_2 em meio de cultura α -MEM suplementado com 15% em volume de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina. A troca do meio de cultura foi feita a cada 3-4 dias e após 15 dias de cultivo foi realizado o primeiro repique das células, que foram expandidas e caracterizadas na 3^a-6^a passagem.

3.6. Avaliação da frequência de CFU-F e morfologia

Para a análise do potencial clonogênico das CTMs, foi realizado o plaqueamento das células isoladas (células da medula óssea: $2,4 \times 10^5$ células/ cm^2 ; células do osso compacto: $1,2 \times 10^4$ células/ cm^2) e a contagem das colônias contendo mais do que 50 células no 15^o dia de cultivo celular ($n = 11$ animais). A partir do número de colônias foi calculada a frequência de CFU-F. Também foram obtidas fotografias por microscopia eletrônica das colônias no momento da contagem.

Para a caracterização morfológica, as CTMs foram fotografadas por microscopia eletrônica e confocal. Para a análise por imunofluorescência, $1,5 \times 10^4$ CTMs foram cultivadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel Glase, Bielefeld, Alemanha) em placas de 24 poços durante 24 horas. Após esse período, foram lavadas com PBS 1x, fixadas com solução contendo 4% de paraformaldeído diluído em PBS 1x por 15 minutos à temperatura ambiente (TA) e lavadas novamente com PBS 1x por três vezes. Para a marcação do citoesqueleto das células, estas foram permeabilizadas em 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em PBS durante 15 minutos à TA. Em seguida, as células foram lavadas

novamente com PBS 1x por três vezes e incubadas em solução contendo Texas Red X Phalloidin (Invitrogen) diluída 40 vezes em PBS 1x por 50 minutos à TA. Para a marcação do núcleo, as células foram lavadas com PBS 1x por duas vezes e incubadas com DAPI à TA por mais 15 minutos, foram lavadas com PBS 1x e montadas sobre lâminas de vidro com Fluoromount G (EM Sciences, Hatfield, PA).

3.7. Análise do perfil imunofenotípico

As CTMs foram caracterizadas quanto à expressão dos marcadores de superfície de células hematopoéticas CD45, de células endoteliais CD31, de células-tronco hematopoéticas CD117 e dos marcadores típicos de células-tronco murinas Sca-1, CD90.2, CD29 e CD44 (n= 4-5 animais). Para isso, suspensões contendo 1×10^5 MO-CTMs ou OC-CTMs na 4ª - 6ª passagem foram centrifugadas a 1800 rpm por 3 minutos e 0,25 µl de anticorpo foi adicionado por tubo sobre o *pellet* formado. Foram utilizados os anticorpos (BD Pharmigen) conjugados com alofococianina (APC) anti-CD45, anti-CD31 e anti-CD117 e os conjugados com ficoeritrina (PE) anti-Sca-1, anti-CD90.2, anti-CD29 e anti-CD44. Foi realizada uma incubação no escuro à TA durante 15 minutos. Em seguida, foi feita uma lavagem com PBS 1x e uma nova centrifugação. Então, PBS 1x foi novamente adicionado para análise no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Foram analisados 10 mil eventos para cada marcador e para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo Vx.0.7.

3.8. Indução da diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*

As CTMs foram avaliadas quanto à capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica após induzidas *in vitro* na 3ª – 6ª passagem.

Para a diferenciação adipogênica, 4×10^4 MO-CTMs ou OC-CTMs foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços (n= 3 - 5 poços; 10 animais) e cultivadas em condição de hipóxia (5% O₂) durante 15 dias em meio indutor de adipogênese (meio α-MEM + 15% SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 1 µm de dexametasona, 10 µg/mL de insulina e 100 µM de indometacina) com troca de meio a cada 3-4 dias. Como controle, 1×10^3 MO-CTMs ou OC-CTMs foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços (n= 3 - 5 poços) e cultivadas em meio α-MEM + 15% SFB e 1 % penicilina e estreptomicina. Em paralelo, foi realizada a indução adipogênica em CTMs mantidas em condição de normóxia (21% O₂) no período de indução (n= 3 - 5 poços; 4 animais),

com o objetivo de avaliar a influência da concentração de oxigênio na capacidade de diferenciação adipogênica das CTMs.

Após o período de indução, foi realizada a coloração com *oil red-O*, que cora vesículas lipídicas em vermelho. Para tal, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas em formalina 10% durante 1 hora à TA. Em seguida, foram feitas duas lavagens com água deionizada e as amostras foram incubadas por 5 minutos em solução com 60% de isopropanol e, então, coradas com *oil red-O* durante 1 hora. Após esse tempo, as amostras foram lavadas quatro vezes com água deionizada e fotografadas.

A recuperação do corante foi realizada para a quantificação da diferenciação adipogênica. Para isso, as amostras foram incubadas em isopropanol absoluto sob agitação constante de 250 rpm durante 15 minutos à TA e alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram submetidas à quantificação por densidade óptica (DO) a 500 nm para se estimar a quantidade de corante recuperado.

Para a diferenciação osteogênica, 1×10^4 MO-CTMs ou OC-CTMs foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços ($n = 2 - 6$ poços; 10 animais) e cultivadas em condição de hipóxia (5% O_2) durante 30 dias com meio indutor da osteogênese (meio α -MEM + 15% SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 0,1 µm de dexametasona, 10 mM de beta-glicerolfosfato e 200 µM de ácido ascórbico) com troca de meio a cada 3-4 dias. Como controle, 1×10^3 MO-CTMs ou OC-CTMs foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços ($n = 4 - 6$ poços) e cultivadas em meio α -MEM + 15% SFB e 1 % penicilina e estreptomicina sem adição de indutores. Mais uma vez, também foi realizado o mesmo experimento com cultivo celular em condição de normóxia (21% O_2) durante o período de indução osteogênica das células ($n = 2 - 6$ poços; 4 animais).

Após 30 dias de indução osteogênica, foi realizada a coloração com vermelho de alizarina, o qual cora matriz extracelular calcificada em vermelho. Para tal, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1x, fixadas em formalina 10% durante 30 minutos à TA e lavadas duas vezes com água deionizada. Em seguida, foi realizada a incubação das amostras em vermelho de alizarina 2% (pH 4,1 – 4,3) durante 45 minutos no escuro à TA. Após esse período, as amostras foram lavadas quatro vezes com água deionizada e fotografadas.

Para a quantificação da diferenciação osteogênica foi realizada a recuperação do corante vermelho de alizarina. Para tal, as amostras foram incubadas com ácido

acético 10% por 30 minutos sob agitação constante à 250 rpm à TA. A monocamada celular foi removida mecanicamente dos poços com o auxílio de ponteira de 1ml e as suspensões foram transferidas para tubos, homogeneizadas em vórtex e recobertas com óleo mineral. As amostras foram aquecidas a 85°C por 10 minutos e mantidas em gelo durante 5 minutos. Foram centrifugadas a 20.000 x *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos. O pH das amostras foi ajustado para 4,1-4,5 utilizando-se hidróxido de amônio 10% e as alíquotas foram submetidas à quantificação da DO a 405 nm.

3.9. Avaliação da proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado a fim de avaliar o crescimento das CTMs cultivadas em condições de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). Para tal, 3x10⁴ CTMs na 4ª passagem foram plaqueadas em poços de placas de 6 poços com 3 ml de meio de cultura α-MEM com 15% SFB e 1% penicilina/estreptomicina (n= 3 poços por dia de contagem; 3 animais). Então, durante os próximos 6 dias de cultivo celular foi realizada diariamente a contagem das células viáveis utilizando-se Azul de Trypan. Não foi realizada a troca ou adição de meio de cultura durante o experimento. As células cultivadas durante esse experimento em condição de normóxia foram previamente expandidas em condição de hipóxia, assim como as demais.

3.10. Análise do perfil de expressão gênica

As CTMs (n= 3 animais) na 3ª passagem foram analisadas quanto à expressão dos genes do fator de transcrição relacionado à Runt 2 (*Runx2*), da osteopontina (*Spp1*), da C-X-C quimiocina 12 (*Cxcl12*), da molécula 1 de adesão celular vascular (*Vcam1*) e da proteína homeobox DLX-6 (*Dlx6*). Para isso, o RNA das células foi extraído utilizando-se o *Rneasy Mini Kit* (Qiagen) com a adição da enzima *Dnase Rnase-free Dnase Set* (Qiagen). Em seguida, o RNA extraído foi diluído em água *nuclease-free*, quantificado e armazenado a -80°C.

A transcrição reversa em cadeia de DNA complementar foi realizada a partir de 1 µg do RNA extraído, utilizando-se *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). O material foi armazenado a -20°C e para a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi diluído dez vezes. Na PCR em tempo real foram utilizadas as sondas murinas específicas (Thermo Fisher Scientific) para os genes *Runx2* (Mm00501584_m1), *Spp1* (Mm00436767_m1),

Cxcl12 (Mm00445553_m1), *Vcam1* (Mm01320970_m1), *Dlx6* (Mm01166201_m1) e como controles endógenos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) (Mm99999915_g1) e β -actina (*Actb*) (Mm00607939_s1) e foi realizada pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems). Para o cálculo do nível de expressão dos transcritos foram utilizados os valores de *cycle threshold* (Ct), realizando a normalização a partir dos genes endógenos.

3.11. Avaliação da aderência das células ao biomaterial

A fim de avaliar a capacidade de adesão de CTMs e das células endoteliais humanas da microvasculatura do pulmão (HMVECs, do inglês *Human Lung Microvascular Endothelial Cells*) ao biomaterial, etapa importante para a realização do implante, foram realizados testes *in vitro*. Assim, 3×10^5 OC-CTMs na 5ª passagem diluídas em 50 μ l de solução com meio de cultura EGM-2MV e PBS 1x foram adicionadas ao biomaterial de aproximadamente 6,6 mm x 7,5 mm x 7 mm com o uso de seringas, o qual foi previamente mantido em PBS 1x por 5 minutos e secado com gaze estéril. O biomaterial Gelfoam® (Pfizer) foi obtido comercialmente e é uma esponja estéril de gelatina absorvível produzida a partir de pele de porco purificada.

Após a adição das células, o biomaterial foi mantido em estufa a 37°C por 1 hora em placa de cultivo de 24 poços de baixa aderência. Então, foi adicionado meio de cultura EGM-2MV e a amostra armazenada em estufa em condição de hipóxia (5% O₂). Durante os próximos 3 dias de cultivo celular no biomaterial não foi realizada a adição ou troca do meio de cultura e foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de fluorescência para rastreamento das CTMs, uma vez que são células isoladas de camundongos geneticamente modificados para a expressão de GFP.

Para avaliar a adesão das HMVECs ao biomaterial foi realizada sua marcação com fluorescência verde. Para isso, foi utilizado o Kit PKH67 GL (Sigma-Aldrich) e foram adicionados 300 μ l de “tampão c” fornecido pelo Kit no *pellet* com 5×10^5 HMVECs e uma mistura de 300 μ l contendo 5 μ l de PKH67 diluído em tampão. Em seguida, as HMVECs foram incubadas a 37°C durante 5 minutos, lavadas duas vezes com solução a base de PBS 1x e 1% de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) e ressuspensas em meio de cultura EGM-2MV. Então, 1×10^5 HMVECs foram adicionadas ao biomaterial com o auxílio de seringa. Foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de fluorescência após 24 horas de cultivo celular das HMVECs no biomaterial.

3.12. Estabelecimento do protocolo para adição das células ao biomaterial e implante em camundongos

Foram avaliados três protocolos diferentes de implante das CTMs visando a formação do nicho hematopoético heterotópico, os quais foram referidos neste trabalho como protocolo de implante 1, 2 e 3. Os protocolos utilizados estão esquematizados na **figura 3** e foram melhor detalhados nos próximos tópicos. De forma geral, as principais diferenças entre os protocolos foram com relação à quantidade de células implantadas, uso de indutores da diferenciação osteogênica e biomaterial ou material de suporte utilizado. As alterações foram realizadas a fim de favorecer a geração do nicho hematopoético heterotópico diante dos resultados obtidos em cada etapa.

3.12.1. Protocolo de implante 1

O protocolo de implante 1 foi baseado em adaptações do protocolo utilizado por Passaro *et al.* (2017). Considerando que este protocolo foi utilizado inicialmente a fim de realizar-se as padronizações necessárias, foi feito apenas com a utilização de OC-CTMs. O biomaterial utilizado foi o Gelfoam® (Pfizer), o mesmo usado para testes de adesão das células e as células endoteliais implantadas em conjunto com as CTMs foram HMVECs.

Os implantes foram realizados em três grupos experimentais: implante de biomaterial (controle negativo); biomaterial + OC-CTMs; biomaterial + OC-CTMs + HMVECs. Em cada grupo experimental o implante foi feito em um animal e cada animal recebeu dois implantes semelhantes, um no flanco esquerdo e outro no direito. As CTMs implantadas foram isoladas de um único animal.

Para tal, 3×10^5 OC-CTMs na 5ª passagem foram diluídas em uma solução de 50 µl contendo meio de cultura EGM-2MV e PBS 1x, a qual foi inserida no biomaterial de aproximadamente 6,6 mm x 7,5 mm x 7 mm utilizando-se seringa de 1 ml e agulha de 26G. Antes da adição das células, os pedaços de biomaterial foram mantidos em PBS 1x durante 5 minutos e secados em gaze estéril para a retirada do excesso do líquido. Nos implantes com células endoteliais, também foram adicionadas ao biomaterial 1×10^5 HMVECs na 4ª passagem.

Então, o biomaterial foi transferido para placas de 24 poços de baixa aderência e mantido em estufa a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, 2,5 ml de meio de cultura

EGM-2MV foram adicionados em cada poço e os biomateriais foram mantidos em estufa em condição de hipóxia (5% O₂) por 24 horas. Após esse período foram realizados os implantes em camundongos. Os biomateriais que foram implantados no grupo experimental controle passaram pelos mesmos procedimentos descritos, mas não receberam células.

Para o implante nos camundongos da linhagem NSG foi feita a analgesia dos animais com 200 mg/kg de dipirona 4 horas antes do procedimento cirúrgico. Então, foi realizada a tricotomia e a anestesia inalatória com isoflurano 2% para a indução e manutenção da anestesia. Uma incisão dorsal de aproximadamente 1 cm foi feita na altura do flanco do animal. O subcutâneo foi divulsionado lateralmente utilizando-se material estéril e o biomaterial foi implantado. Os animais receberam dipirona novamente após o procedimento cirúrgico a cada 12 horas durante 2 dias e 20 mg/kg de tramadol logo após a cirurgia e a cada 12 horas durante 3 dias, ambos por via intraperitonal.

O peso dos animais foi obtido antes do procedimento e semanalmente durante o período em que permaneceram com os implantes. A retirada do tecido formado no local do implante foi realizada após 57 dias e o peso dos organoides no momento de sua retirada foi obtido.

3.12.2. Protocolo de implante 2

O protocolo de implante 2 foi definido a partir dos resultados obtidos com os experimentos utilizando o protocolo 1. Assim, foram feitas alterações visando potencializar a formação do nicho hematopoético heterotópico. Dentre elas estão as modificações na linhagem de células endoteliais, na quantidade de células implantadas e a utilização da BMP-4 como indutor osteogênico. Assim, para a realização deste protocolo foram utilizadas MO-CTMs, OC-CTMs e células endoteliais humanas da veia umbilical (HUVECs, do inglês *Human umbilical vein endothelial cells*). Novamente, o biomaterial implantado foi o Gelfoam®, já descrito anteriormente.

Os implantes foram realizados em sete grupos experimentais, sendo eles o implante de biomaterial (controle negativo); biomaterial + BMP-4 (controle negativo); biomaterial + BMP-4 + HUVECs (controle negativo); biomaterial + BMP-4 + MO-CTMs; biomaterial + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs; biomaterial + BMP-4 + OC-CTMs; e biomaterial + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs. Em cada grupo experimental dois animais foram implantados e cada animal recebeu um ou dois implantes. Nos animais

que foram realizados apenas um implante, este foi feito no flanco direito. Foram implantadas CTMs isoladas de dois animais em diferentes implantes.

Para a adição das células ao biomaterial foram utilizadas as mesmas etapas descritas anteriormente no protocolo de implante 1, no entanto foram adicionadas 7×10^5 MO-CTMs ou OC-CTMs na 5ª passagem e/ou 7×10^5 HUVECs na 3ª passagem. Após a incubação do biomaterial por 24 horas, foram adicionados 200 ng de BMP-4 por biomaterial e, em seguida, foi realizado o implante em camundongos utilizando-se, mais uma vez, a metodologia descrita para o protocolo 1.

A fim de avaliar a formação de tecido ósseo no local do implante foi realizado um exame radiológico nos animais implantados após 63 dias. O exame foi realizado em clínica veterinária pelos profissionais responsáveis. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com 10 mg/kg de xilazina 2%. O peso dos animais foi obtido semanalmente e 74 dias após o implante o organoide formado no local foi retirado. Foram obtidas fotografias dos animais e dos organoides formados no momento de sua retirada para a análise macroscópica e o tamanho dos organoides foi anotado.

3.12.3. Protocolo de implante 3

O protocolo de implante 3, diferente dos anteriores, baseou-se na utilização de Matrigel® como suporte para as células, com a adição de grânulos de HA (Straumann Cerabone) e com o aumento no número de CTMs implantadas.

Os implantes foram realizados em três grupos experimentais, sendo eles o implante de matrigel + HA + HUVECs (controle negativo); matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs; matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs. Em cada grupo experimental três ou quatro animais foram implantados, recebendo um ou dois implantes cada. As CTMs implantadas foram isoladas de dois animais.

Para a adição das células ao material de suporte com HA, $1,5 \times 10^6$ MO-CTMs ou OC-CTMs na 4ª passagem e/ou 5×10^5 HUVECs na 5ª - 6ª passagem foram ressuspensas em 500 µl de meio de cultura EGM-2MV. Em cada tubo contendo células e meio de cultura foram adicionados 40 mg de grânulos de 0,5 – 1,0 mm de HA. Então, os tubos foram mantidos sob agitação constante de 150 rpm a 37°C por 90 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para a formação dos *pellets*.

Após a formação dos *pellets* com células e grânulos de HA, o meio de cultura foi retirado e 300 µl de matrigel foram adicionados no momento do implante, que foi

realizado com seringas e agulhas de 18G em camundongos da linhagem NSG. O material utilizado para a manipulação do matrigel foi mantido refrigerado. Os implantes foram realizados no flanco dos animais. Para isso, foi realizada a tricotomia dos animais antes do implante e a anestesia inalatória com isoflurano 2% para indução e manutenção da anestesia.

Os animais foram pesados antes do experimento e semanalmente. Após 29 dias, foram submetidos a exame radiológico para análise da formação óssea no local. Então, 76 dias após o implante, o organoide foi retirado. Os animais e os organoides foram fotografados e foi adquirido o tamanho de cada organoide.

Figura 3. Protocolos de implante. Foram avaliados três protocolos de implante de CTMs. O protocolo 1 baseou-se na adição de $3 \cdot 10^5$ OC-CTMs e $1 \cdot 10^5$ HMVECs ao biomaterial e implante em camundongos, com a retirada após 57 dias. O protocolo 2 baseou-se no implante do biomaterial com $7 \cdot 10^5$ MO-CTMs ou OC-CTMs e $7 \cdot 10^5$ HUVECs com BMP-4. Após 63 dias foi realizado o exame radiológico e com 74 dias os organoides foram retirados. O protocolo 3 consistiu no implante de $1,5 \cdot 10^6$ MO-CTMs ou OC-CTMs com $5 \cdot 10^5$ HUVECs em matrigel e grânulos de HA. Após 29 dias foi realizado o exame radiológico e 76 dias depois do implante os organoides foram retirados.

3.13. Retirada do tecido formado no local do implante

Para a retirada do tecido formado no local do implante, foi obtido o peso dos animais e, em seguida, realizada a eutanásia utilizando-se 300 mg/kg de ketamina e 30 mg/kg de xilazina via intraperitoneal. Para a obtenção de fotografias dos animais no momento da retirada, foi realizada previamente a tricotomia na região do flanco do animal, onde foi realizado o implante. Então, os organoides foram retirados com o auxílio de material cirúrgico estéril e armazenados em solução de formalina 10%.

3.14. Análise do tecido formado no local do implante

Após sua retirada, os organoides foram mantidos em solução de formalina 10% durante 24 horas para fixação e, em seguida, transferidos para solução de álcool 70%. Para o seu processamento foram incubados em soluções de álcool 70%, 80%, 90% durante 1 hora em cada e álcool 95% *overnight*. Em seguida, foram incubados em três soluções de álcool absoluto por 1 hora cada. Depois foram feitas novas incubações em álcool e xilol e três soluções de xilol por 3 minutos em cada. Então, as amostras foram incubadas em parafina por 4 horas e incluídas em parafina.

No caso dos organoides obtidos com o protocolo de implante 3, em que foram utilizados grânulos de HA, foi realizada previamente a descalcificação do tecido com incubação por 7 dias em solução de EDTA a 4% com pH 7,4.

Então, foram obtidos cortes de 5 µm das amostras processadas. Para a análise histológica, foi realizada coloração com hematoxilina e eosina e com tricômico de Masson. Adicionalmente, foi feita a análise por imunohistoquímica para fosfatase alcalina.

3.15. Coloração com hematoxilina e eosina

Para a coloração com hematoxilina e eosina dos cortes de tecidos congelados, foi realizada a desparafinização com incubações em três soluções de xilol por 5 minutos cada e a hidratação das amostras com incubação em soluções de álcool 100%, 90%, 80% e 70% por 1 minuto em cada. Após lavagem com água, as amostras foram imersas em hematoxilina e mantidas durante 30 segundos. Então, foram lavadas em água por 5 minutos e imersas em eosina por 1 minuto. Por fim, as lâminas foram rapidamente imersas em soluções de álcool 70%, 80%, 90% e absoluto e, posteriormente em xilol, secadas à TA e montadas em ERV-mount (EasyPath).

3.16. Coloração com tricômico de Masson

Para a coloração com tricômico de Masson dos cortes de tecidos congelados foi utilizado o Kit “*Colorações tricômicas (Masson) accustain*” (Sigma-Aldrich). Inicialmente, para a remoção da parafina das amostras, estas foram incubadas em três soluções de xilol por 10 minutos em cada e em solução de álcool/xilol durante 10 minutos. Para a hidratação das amostras, foi realizada a incubação em álcool absoluto, 90%, 80% e 70% durante 3 minutos em cada. Então, as amostras foram lavadas com água corrente e aplicado o protocolo fornecido pelo fabricante. Ao final, as amostras foram novamente hidratadas com o processamento em álcool e xilol, secadas à TA e as lâminas foram montadas em ERV-mount (EasyPath).

3.17. Análise por imunohistoquímica

Para a análise por imunohistoquímica, cortes das amostras dos organoides foram adicionados em lâminas tratadas com silano 6%, secados e mantidos a 37°C *overnight*. Em seguida, foi realizada a desparafinização e hidratação das amostras com incubações em três soluções de xilol por 5-6 minutos, álcool e xilol por 5 minutos, três soluções de álcool por 1 minuto em cada e álcool 95%, 80% e 70% por 1 minuto em cada. Foi realizada a lavagem em água corrente. Para a recuperação antigênica, foi feita a incubação em tampão de citrato por 7 minutos com aquecimento, resfriamento das amostras por 20 minutos, incubação em PBS 1x com pH 7,4 durante 5 minutos e a adição do tampão de bloqueio da peroxidase por 10 minutos. Após incubações em PBS 1x e tampão tris salino *tween* (TBSt) por 5 minutos em cada, foi adicionada a *protein block* fornecida pelo kit *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC detection Kit-micro polymer* (ab236466) por 10 minutos e incubação com o anticorpo primário anti-fosfatase alcalina (ab108337) durante 2 horas.

Novamente, as amostras foram lavadas com tampão tris salino (TBS) e incubadas com o anticorpo secundário *goat anti-rabbit HRP conjugate*, também fornecido pelo kit, durante 15 minutos. As amostras foram lavadas com TBSt e solução de Tris-HCl e, para a revelação da técnica foram incubadas em DAB por 6 minutos e, após a adição de água destilada, as amostras foram coradas com hematoxilina de harris por 30 segundos, desidratadas e montadas em ERV-mount (EasyPath).

3.18. Análises estatísticas

Os dados obtidos com os experimentos foram avaliados qualitativamente e quantitativamente. Para a análise qualitativa foram utilizadas fotografias das células, dos animais, dos tecidos formados após o implante e da sua histologia e imagens obtidas pelo exame radiológico realizado com os animais. Enquanto, os resultados da quantidade de células isoladas, da contagem de CFU-F, da análise por citometria de fluxo, da recuperação dos corantes nos testes de diferenciação *in vitro*, do número de células no ensaio de proliferação celular, da análise de expressão gênica e do tamanho e peso dos tecidos formados após implante serviram como base para a análise quantitativa. Para as análises estatísticas foi utilizado o software Graphpad Prism 6 e foi assumido um nível de significância igual a 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento de células da medula óssea e do osso compacto

Durante o isolamento das CTMs, registramos o número total de células isoladas com o *flushing* da medula óssea e com a digestão em colagenase tipo IA do osso compacto. A partir das amostras da medula óssea foram obtidas em média $4,6 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ células e com as amostras do osso compacto foram obtidas $9,1 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$ células (n= 11 animais). Portanto, o número de células obtidas da medula óssea foi aproximadamente 5 vezes maior do que o número de células isoladas do osso compacto (teste t de Student pareado; $p < 0,0001$) (**figura 4**).

Figura 4. Número total de células isoladas a partir da medula óssea e do osso compacto. Os dados apresentados são referentes aos isolamentos de células realizados a partir da medula óssea e do osso compacto de 11 animais. Foram encontradas diferenças entre o número total de células isoladas das duas fontes comparadas (teste t de Student pareado; **** $p < 0,0001$), de modo que a partir da medula óssea foram obtidas aproximadamente 5 vezes mais células com relação ao osso compacto.

4.2. Potencial Clonogênico

Em seguida, avaliamos a frequência de CTMs com base na eficiência clonogênica (ou frequência de CFU-F) das células isoladas da medula óssea e do osso compacto. Para tanto, células obtidas destas duas fontes foram plaqueadas em baixa densidade imediatamente após seu isolamento para permitir a formação de colônias. Após 15 dias de cultivo, registramos e comparamos entre ambas as fontes, o número de colônias contendo mais de 50 células.

Células isoladas da medula óssea e do osso compacto aderiram à superfície plástica da garrafa de cultivo celular e formaram colônias, demonstrando a capacidade

de aderência e o potencial clonogênico dessas células, ambas características típicas das CTMs. A **figura 5** traz imagens de colônias de células isoladas a partir das duas fontes estudadas. Como demonstrado, não foram encontradas diferenças com relação à morfologia das colônias de células isoladas da medula óssea e do osso compacto.

Figura 5. Potencial clonogênico das CTMs. Colônias de células obtidas 15 dias após o isolamento das células da medula óssea e do osso compacto, confirmando o potencial clonogênico das MO-CTMs e OC-CTMs. Imagens de microscopia eletrônica de controle de fase (à esquerda) e de fluorescência (à direita). Barra = 200µm.

A frequência de CFU-F obtida a partir das células isoladas da medula óssea foi $0,0003\% \pm 0,0001\%$ enquanto que com as células do osso compacto foi de $0,008\% \pm 0,007\%$ ($n = 11$ animais). Assim, foram encontradas diferenças na comparação entre as duas fontes de células com relação à frequência de CFU-F (teste t de Student pareado; $p=0,0054$), de modo que nas amostras do osso compacto esta foi 25 vezes maior em relação às da medula óssea. Na **figura 6** pode-se observar um gráfico com informações da frequência de colônias derivadas das duas fontes em diferentes isolamentos, demonstrando variação dos resultados obtidos principalmente com o osso compacto nos isolamentos realizados com diferentes animais e reforçando o baixo número de colônias apresentado pelas amostras da medula óssea. Esses resultados indicam que dentre o total de células isoladas de cada uma das fontes, há uma maior concentração de CTMs nas amostras obtidas do osso compacto.

Figura 6. Frequência de CFU-F obtida com o isolamento das células da medula óssea e do osso compacto. Os dados apresentados são referentes às médias da frequência de CFU-F obtidas nos isolamentos de células realizados a partir da medula óssea e do osso compacto de 11 animais. A contagem das colônias foi realizada 15 dias após o isolamento das células, antes do primeiro repique. Foram encontradas diferenças entre a frequência de CFU-F nas duas fontes estudadas (teste t de Student pareado; $**p=0,0054$), onde o osso compacto apresentou valores 25 vezes maiores.

4.3. Morfologia

As CTMs isoladas da medula óssea e do osso compacto apresentaram morfologia fibroblastóide durante o período em que foram mantidas em cultivo, outra característica típica desse tipo celular. A morfologia apresentada pelas CTMs pode ser observada na **figura 7**. Durante as diversas passagens analisadas, não foram encontradas alterações significativas na morfologia das CTMs. De forma geral, observamos que a população de MO-CTMs era composta principalmente por células com uma maior relação citoplasma/núcleo, enquanto as OC-CTMs demonstravam apresentar menor tamanho. No entanto, essa característica não ocorreu em todas as populações de OC-CTMs.

Adicionalmente, considerando que as células foram isoladas de camundongos C57BL/6^{GFP}, uma linhagem geneticamente modificada para expressar GFP em todos os tecidos, avaliamos a expressão dessa proteína pelas CTMs. Fotografias obtidas por microscopia de fluorescência mostraram que as CTMs expressavam GFP, como pode ser observado nas imagens à direita da **figura 7A**.

Além disso, análises por imunofluorescência utilizando microscopia confocal também demonstraram a morfologia fibroblastóide das CTMs e a expressão de GFP (**figura 7B**).

Figura 7. Morfologia fibroblastóide das CTMs. **A.** Imagens de microscopia eletrônica de controle de fase (à esquerda) e de fluorescência (à direita). As CTMs estavam na 4ª passagem. Barra = 100µm (imagens acima) e 50µm (imagens abaixo). **B.** Imagens de microscopia confocal. Marcação com DAPI e faloidina evidenciando o núcleo e o citoesqueleto das células, respectivamente. As CTMs estavam na 5ª passagem. Barra = 100µm (imagens acima) e 50µm (imagens abaixo).

4.4. Perfil imunofenotípico

As CTMs foram caracterizadas quanto ao perfil imunofenotípico na 4^a-6^a passagem com relação a marcadores de superfície típicos de células-tronco murinas e comumente utilizados para a caracterização de CTMs de camundongos, sendo eles Sca-1, CD90.2, CD44 e CD29. Também foi avaliada a presença de células positivas para os marcadores de células hematopoéticas CD45, de células endoteliais CD31 e de células progenitoras hematopoéticas CD117, a fim de avaliar a contaminação por esses tipos celulares nas culturas de CTMs (n = 4 - 5 animais).

As análises com a população de MO-CTMs demonstraram que aproximadamente 80,13% (+/- 14,56%) das células eram positivas para o marcador Sca-1, 78,77% (+/- 10,94%) para CD90.2, 35,15% (+/- 19,67%) para CD44 e 88,45% (+/- 7,85%) para CD29. Quanto à população das OC-CTMs, aproximadamente 89,66% (+/- 4,27%) das células eram positivas para o marcador Sca-1, 73,89% (+/- 20,79%) para CD90.2, 76,99% (+/- 6,53%) para CD44 e 94,66% (+/- 3,02%) para CD29. Esses dados estão representados na **figura 8 A**. Comparações na quantidade de células positivas para tais marcadores de superfície entre as populações de MO-CTMs e OC-CTMs demonstrou diferenças apenas para o marcador CD44 (teste t de Student pareado; p = 0,0082), onde as OC-CTMs apresentaram valores aproximadamente 2 vezes maiores que as MO-CTMs.

Com relação aos marcadores de superfície comumente negativos para as CTMs, observamos que a população de MO-CTMs era composta em média por 24,20% (+/- 20,87%) de células positivas para CD45, 2,45% (+/- 4,91%) para CD31 e 8,87% (+/- 11,72%) para CD117. Enquanto a população de OC-CTMs apresentou 6,77% (+/- 4,78%) de células positivas para CD45, 3,71% (+/- 5,21%) para CD31 e 2,39% (+/- 3,83%) para CD117 (**figura 8 A**). A comparação com base em tais marcadores entre as populações de MO-CTMs e OC-CTMs na 4^a-6^a passagem não demonstrou diferenças.

É importante destacar que, mesmo não apresentando diferenças estatísticas, a média de células positivas para CD45 observada principalmente na população de MO-CTMs foi elevada com relação ao esperado. Esses resultados sugerem que mesmo após diversas passagens e a esperada seleção das CTMs devido às condições de cultivo adequadas e específicas para sua expansão, parte das células hematopoéticas CD45⁺ também foram capazes de permanecer na cultura celular, tornando a população contaminada por esse tipo celular.

Ainda com relação à expressão de CD45 por células da população de MO-CTMs nota-se uma variação entre os resultados obtidos com as células isoladas de diferentes animais. Esses dados estão mais detalhados na **figura 8 B** e é possível observar que dos resultados obtidos com células provenientes de 5 animais, em 2 deles foram encontradas porcentagens de células CD45⁺ maiores que 30% nas populações de MO-CTMs. Já nas populações de OC-CTMs, esses valores foram abaixo de 15% em todos os casos.

Figura 8. Perfil imunofenotípico das CTMs. **A.** Porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície típicos de células-tronco murinas Sca-1, CD90.2, CD44 e CD29, de células hematopoéticas CD45, de células endoteliais CD31 e de células-tronco hematopoéticas CD117 nas populações de MO-CTMs e OC-CTMs. Comparações entre as duas populações demonstraram diferenças apenas para a porcentagem de células positivas para o marcador de superfície CD44 (Teste t de Student pareado; **p = 0,0082; n = 5 animais), onde a população de OC-CTMs apresentou valores aproximadamente 2 vezes maiores que a população de MO-CTMs. **B.** Porcentagem de células positivas para o marcador de superfície CD45 nas populações de CTMs isoladas a partir da medula óssea e do osso compacto de 5 animais. Foi observada variação entre os valores obtidos com as amostras da medula óssea.

4.5. Capacidade de diferenciação *in vitro*

As CTMs foram caracterizadas quanto à capacidade de diferenciação *in vitro* após cultivo em meios indutores de diferenciação adipogênica e osteogênica (n = 10 animais). Além disso, avaliamos se a alteração das condições de cultivo celular de hipóxia (5% O₂) para normóxia (21% O₂) durante o período de indução da diferenciação modularia os potenciais adipogênico e osteogênico das CTMs (n = 4 animais).

Com relação à adipogênese, foi observado que após 15 dias de indução as MO-CTMs e OC-CTMs foram capazes de acumular vesículas lipídicas, evidenciadas pela coloração em vermelho com o corante *oil red-O* (**figura 9 A**). Todas as amostras de CTMs (MO-CTMs e OC-CTMs) provenientes dos 10 animais foram capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica.

A quantificação do corante *oil red-O* por absorbância óptica demonstrou que as CTMs induzidas à diferenciação incorporaram maior quantidade deste corante do que as CTMs não induzidas (**figura 9 B**). Estes dados quantitativos confirmam a diferenciação adipogênica das CTMs de ambas as fontes (MO-CTMs: p < 0,0001; OC-CTMs: p = 0,0025; teste t de Student pareado). Além disso, esta mesma análise demonstrou que tanto as MO-CTMs quanto as OC-CTMs produziram a mesma quantidade de lipídeos corados com *oil red-O* e, portanto, apresentaram o mesmo potencial de diferenciação adipogênica (**figura 9 B**).

Figura 9. Capacidade de diferenciação adipogênica das CTMs. **A.** Diferenciação adipogênica das CTMs após 15 dias de indução. Coloração: *oil red O* e hematoxilina. Barra = 20 µm. **B.** Quantificação do corante *oil red O*. As CTMs induzidas à diferenciação diferiram das não induzidas. (Teste t de Student pareado; **p = 0,0025; ****p < 0,0001). **DIF:** grupo experimental induzido à diferenciação adipogênica durante 15 dias. **CT:** grupo controle, não ocorreu indução adipogênica.

As CTMs cultivadas em normóxia durante o período de indução à adipogênese também foram capazes de acumular vesículas lipídicas (**figura 10 A**). A comparação dos resultados obtidos com a análise quantitativa da indução adipogênica entre as duas condições de cultivo demonstrou diferenças para as MO-CTMs (teste t de Student pareado; $p = 0,0325$), como pode ser observado no gráfico da **figura 10 B**. Esses resultados mostram que a alteração da concentração de oxigênio de 5% para 21% no cultivo das CTMs especificamente durante o período de indução proporcionou um aumento de aproximadamente 1,47 vezes na capacidade de diferenciação adipogênica das MO-CTMs. A comparação dos resultados com as MO-CTMs e OC-CTMs induzidas à diferenciação em cultivo em normóxia não apresentou diferenças, assim como observado para a indução em condição de hipóxia.

Figura 10. Comparação da diferenciação adipogênica das CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). **A.** Diferenciação adipogênica das CTMs. Coloração: *oil red O* e hematoxilina. Barra = 50 μ m. **B.** Quantificação do corante *oil red O*. As MO-CTMs induzidas em normóxia apresentaram adipogênese 1,47 vezes maior que as em hipóxia (teste t de Student pareado; $*p = 0,0325$) e as MO-CTMs induzidas diferiram dos controles em hipóxia (Teste t de Student pareado; $***p = 0,0009$) e normóxia (Teste t de Student pareado; $***p = 0,0005$). Foram encontradas diferenças entre as OC-CTMs induzidas e os controles em hipóxia (Teste t de Student pareado; $**p = 0,0022$) e normóxia (Teste t de Student pareado; $**p = 0,0036$). **DIF:** grupo experimental induzido à diferenciação adipogênica durante 15 dias. **CT:** grupo controle, não ocorreu indução adipogênica.

Quanto à osteogênese, ocorreu uma limitação na diferenciação das CTMs estudadas. Diferente do observado para a adipogênese, algumas amostras de CTMs não foram capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica. Assim, para as MO-CTMs, apenas 20% das amostras (2/10 animais) apresentaram indícios de deposição de matriz extracelular calcificada, identificada pela coloração com vermelho de alizarina. Para as OC-CTMs essa frequência foi maior, alcançando 80% das amostras (8/10 animais). Imagens obtidas das CTMs induzidas à diferenciação osteogênica durante 30 dias estão expostas na **figura 11**, onde pode-se observar em vermelho matriz extracelular calcificada produzida pelas células.

A análise quantitativa da diferenciação osteogênica (**figura 12**) não demonstrou diferenças entre as populações de MO-CTMs e OC-CTMs. No entanto, é importante considerarmos o elevado desvio padrão apresentado pelas OC-CTMs, uma vez que em determinados casos não houve indícios de diferenciação e, em outros, foi observada intensa deposição de matriz extracelular calcificada, como demonstrado na **figura 11**. Adicionalmente, a análise estatística não revelou diferenças entre os grupos experimentais induzidos à diferenciação e seus respectivos grupos controles.

A comparação da diferenciação osteogênica entre as duas condições de cultivo foi realizada com as quatro últimas amostras de MO-CTMs e OC-CTMs ilustradas na **figura 11**. Observamos que com apenas uma das amostras houve alteração dos resultados com a mudança da condição de cultivo (**figuras 11, 13 A e 14 A**). Neste caso em específico, as MO-CTMs não foram capazes de se diferenciar quando induzidas sob hipóxia, porém secretaram matriz extracelular calcificada após indução em normóxia (**figura 13 A**). A análise quantitativa dos resultados em conjunto não demonstrou diferenças na osteogênese entre as MO-CTMs cultivadas em hipóxia e normóxia e entre as OC-CTMs cultivadas nas duas condições (**figuras 13 B e 14 B**). Também não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais induzidos à diferenciação e seus respectivos grupos controles.

Figura 11. Capacidade de diferenciação osteogênica das CTMs. Diferenciação osteogênica das CTMs após 30 dias de indução. A matriz extracelular calcificada produzida pelas CTMs foi corada em vermelho. Os testes foram realizados com CTMs isoladas de 10 animais, todos indicados na imagem. Coloração: vermelho de alizarina. Barra = 100 µm.

Figura 12. Quantificação da diferenciação osteogênica. Não foram encontradas diferenças entre as MO-CTMs e OC-CTMs com relação à capacidade de diferenciação osteogênica com base na recuperação do corante e os grupos experimentais induzidos à diferenciação não diferiram de seus respectivos controles. **DIF:** grupo experimental induzido à diferenciação osteogênica durante 30 dias. **CT:** grupo controle, não ocorreu indução osteogênica.

Figura 13. Comparação da diferenciação osteogênica das MO-CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). **A.** Diferenciação osteogênica das MO-CTMs após 30 dias de indução em condição normóxia. A matriz extracelular calcificada secretada pelas MO-CTMs foi corada em vermelho. Coloração: vermelho de alizarina. Barra = 100 µm. **B.** Quantificação da diferenciação osteogênica pela recuperação do corante vermelho de alizarina. Não foram encontradas diferenças entre as MO-CTMs induzidas em hipóxia e normóxia. **DIF:** grupo experimental induzido à diferenciação osteogênica durante 30 dias. **CT:** grupo controle, não ocorreu indução osteogênica.

Figura 14. Comparação da diferenciação osteogênica das OC-CTMs induzidas em cultivo em condição de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). **A.** Diferenciação osteogênica das OC-CTMs após 30 dias de indução em condição normóxia. A matriz extracelular calcificada secretada pelas OC-CTMs foi corada em vermelho. Coloração: vermelho de alizarina. Barra = 100 µm. **B.** Quantificação da diferenciação osteogênica pela recuperação do corante vermelho de alizarina. Não foram encontradas diferenças entre as OC-CTMs induzidas nas condições de hipóxia e normóxia. **DIF:** grupo experimental induzido à diferenciação osteogênica durante 30 dias. **CT:** grupo controle, não ocorreu indução osteogênica.

4.6. Proliferação celular

Comparamos as MO-CTMs e OC-CTMs com relação ao seu potencial proliferativo. Adicionalmente, avaliamos se o cultivo celular em condição de normóxia (21% O₂) acarretaria em alterações na proliferação das células com relação ao cultivo em hipóxia (5% O₂).

A **figura 15 A** mostra o número de células viáveis ao longo do cultivo em hipóxia. A análise estatística realizada separadamente para cada período de contagem das células não demonstrou diferenças entre o número de MO-CTMs e OC-CTMs em nenhum dos períodos avaliados. É possível observar que a partir do número de células plaqueadas, houve uma queda na quantidade de células obtida na primeira contagem realizada após 24 horas, sugerindo que parte das células plaqueadas não

aderiram à superfície da garrafa de cultivo. Ao final do experimento, ou seja, após 144 horas, a média do número de MO-CTMs foi 2,7 vezes maior que a quantidade de células plaqueadas e de OC-CTMs foi 2,4 vezes maior.

As MO-CTMs e OC-CTMs cultivadas em normóxia também tiveram uma cinética de crescimento equivalente. A **figura 15 B** mostra as médias dos números de células viáveis obtidas diariamente e, mais uma vez, é possível observar uma diminuição na quantidade de células após 24 horas com relação ao número de células inicial.

Comparando os resultados obtidos nos experimentos realizados nas duas condições de cultivo, foi visto que tanto para as MO-CTMs como para as OC-CTMs não foram encontradas diferenças no número de células obtidas no cultivo em hipóxia e em normóxia. Esses resultados indicam que no período de 144 horas a alteração da condição de cultivo celular de hipóxia para normóxia não alterou a capacidade proliferativa das CTMs. É importante destacar que o período analisado pode não ser o suficiente para causar alterações celulares detectáveis pelo experimento e que a longo prazo resultados diferentes poderiam ser obtidos.

Figura 15. Potencial proliferativo das CTMs. **A.** Número de CTMs obtido diariamente durante 144 horas de cultivo em condição de hipóxia (5% O₂). **B.** Número de CTMs obtido diariamente durante 144 horas de cultivo em condição de normóxia (21% O₂). Os dados apresentados são referentes aos resultados da contagem de células isoladas de três animais e a média relativa a cada uma delas foi obtida com triplicatas experimentais. Não foram encontradas diferenças entre MO-CTMs e OC-CTMs em nenhum dos períodos e condições de cultivo analisados.

Também foi possível observar uma heterogeneidade quanto ao potencial proliferativo das CTMs, de modo que CTMs isoladas de uma mesma fonte, porém de animais diferentes, apresentaram variações com relação ao crescimento celular, principalmente no cultivo em hipóxia. Os gráficos da **figura 16** mostram as curvas de

proliferação separadas das CTMs isoladas dos três animais, referidas como MO-CTM/OC-CTM 1, 2 ou 3. Como destaque, pode-se citar a OC-CTM 2 cultivada em hipóxia (**figura 16 B**), que após 144 horas apresentou um número de células 2,4 vezes maior que a OC-CTM 1 e 3,8 vezes maior que a OC-CTM 3. Adicionalmente, nota-se que as MO-CTM 3 e OC-CTM 3 apresentaram baixo potencial proliferativo nas duas condições de cultivo.

Figura 16. Potencial proliferativo das CTMs isoladas de diferentes animais durante cultivo em condição de hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). **A.** Número de MO-CTMs obtido diariamente em cada um dos testes durante 144 horas de cultivo em condição de hipóxia (5% O₂). **B.** Número de MO-CTMs obtido diariamente em cada um dos testes durante 144 horas de cultivo em condição de normóxia (21% O₂). **C.** Número de OC-CTMs obtido diariamente em cada um dos testes durante 144 horas de cultivo em condição de hipóxia (5% O₂). **D.** Número de OC-CTMs obtido diariamente em cada um dos testes durante 144 horas de cultivo em condição de normóxia (21% O₂).

4.7. Perfil de expressão gênica

As CTMs foram avaliadas quanto à expressão de genes relacionados com a diferenciação osteogênica e manutenção do nicho hematopoético, sendo eles *Runx2*, *Spp1*, *Cxcl12*, *Vcam1* e *Dlx-6* (n = 3 animais). Também foi avaliada a expressão desses genes pelas CTMs após cultivadas por 7 dias em condição de normóxia, para

comparação dos resultados obtidos no cultivo em hipóxia. A **figura 17** mostra o padrão de expressão gênica apresentado pelas MO-CTMs e OC-CTMs e a comparação realizada entre as duas populações cultivadas em hipóxia não demonstrou diferenças na expressão de nenhum dos genes avaliados. Nota-se que dentre esses genes, *Dlx-6* foi o menos expresso nas duas populações de CTMs, apresentando uma expressão aproximadamente 13132 vezes menor com relação ao *Cxcl-12* no caso das MO-CTMs e 2644 vezes menor nas OC-CTMs. Adicionalmente, *Cxcl-12* foi o gene mais expresso nas populações de MO-CTMs e OC-CTMs.

Com relação aos resultados obtidos após o cultivo em normóxia, foi visto que a expressão do gene *Runx-2* foi 1,7 vezes superior nas MO-CTMs em relação às OC-CTMs (Teste t de Student pareado; $p = 0,0451$). Comparando o perfil de expressão gênica apresentado pelas CTMs nas duas condições de cultivo, foi observado que a expressão de *Vcam1* foi 1,5 vezes maior nas OC-CTMs cultivadas em normóxia em comparação ao cultivo em hipóxia (Teste t de Student pareado; $p = 0,0472$).

Figura 17. Perfil de expressão gênica das CTMs após 7 dias de cultivo em hipóxia (5% O₂) e normóxia (21% O₂). Foram encontradas diferenças com relação à expressão do gene *Runx-2* entre as MO-CTMs e OC-CTMs cultivadas em normóxia (Teste t de Student pareado; $*p = 0,0451$), o qual foi expresso 1,7 vezes mais pelas MO-CTMs. Também foram encontradas diferenças na expressão de *Vcam1* pelas OC-CTMs após cultivo em condição de hipóxia e normóxia (Teste t de Student pareado; $*p = 0,0472$), de modo que foi 1,5 vezes maior quando as células foram cultivadas em normóxia. Nas demais comparações não foram encontradas diferenças com as análises estatísticas. **Hip**: CTMs cultivadas em condição de hipóxia (5% O₂); **Nor**: CTMs cultivadas em condição de normóxia durante 7 dias (21% O₂).

4.8. Adesão das células ao biomaterial

Para garantir que as CTMs fossem implantadas em conjunto com o biomaterial Gelfoam avaliamos a sua capacidade de adesão a este. Para isso, OC-CTMs foram adicionadas ao biomaterial, cultivadas *in vitro* durante 3 dias e rastreadas pela expressão de GFP. Então, por meio de microscopia eletrônica de fluorescência foi visto que as OC-CTMs foram capazes de se aderirem ao biomaterial e de manterem a expressão de GFP durante 3 dias de cultivo (**figura 18**). As HMVECs também foram capazes de aderir à superfície do biomaterial e imagens obtidas após 24 horas (**figura 18**) mostraram que essas células ainda estavam aderidas. Esses resultados permitiram demonstrar que o biomaterial Gelfoam poderia ser usado como arcabouço para o implante de CTMs e HMVECs.

Figura 18. Aderência das células ao biomaterial. Imagens de microscopia eletrônica de fluorescência. As OC-CTMs aderiram ao biomaterial e permaneceram durante 3 dias de cultivo celular expressando GFP, como pode ser observado nas fotografias obtidas diariamente após serem inseridas ao biomaterial. As HMVECs marcadas com PKH67 foram rastreadas após 24 horas e também estavam presentes no biomaterial. Barra = 50µm.

4.9. Organoide formado após o implante

4.9.1. Protocolo de implante 1

A **figura 19** traz os dados da pesagem semanal dos animais que receberam o implante conforme o protocolo 1. Como demonstrado, não ocorreram mortes dos animais receptores dos implantes e alterações de peso consideráveis.

Figura 19. Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 1. n = 1 animal por grupo. **GF:** animal com implante do biomaterial Gelfoam (controle). **GF + HMVECs:** animal com implante de Gelfoam e HMVECs (controle). **GF + HMVECs + OC-CTMs:** animal com implante de Gelfoam, HMVECs e OC-CTMs.

Após 57 dias do implante realizado com o protocolo 1, os implantes foram retirados para análise. Os pesos dos organoides recuperados estão sumarizados na **tabela 1**. A análise estatística demonstrou diferenças entre o grupo controle GF e GF + HMVECs + OC-CTMs (Teste t de Student; $p=0,0299$), de modo que o primeiro apresentou valores aproximadamente 2 vezes maiores que o segundo.

Tabela 1. Peso dos organoides formados 57 dias após o implante realizado com o protocolo 1

Grupo experimental	Peso – organoide lado esquerdo (g)	Peso – organoide lado direito (g)
GF	0,08	0,07
GF+ HMVECs	0,06	0,04
GF+ HMVECs + OC-CTMs	0,03	0,04

Grupos experimentais: **GF:** implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + HMVECs:** implante de biomaterial em conjunto com HMVECs (controle); **GF + HMVECs + OC-CTMs:** implante de biomaterial com HMVECs e OC-CTMs.

A partir da análise histológica com coloração com hematoxilina e eosina (**figura 20**) foi possível observar que nos implantes realizados sem a presença de células (controle negativo) houve manutenção parcial do arcabouço de colágeno do biomaterial e baixa quantidade de núcleos celulares. Nos implantes onde apenas HMVECs foram adicionadas aos biomateriais, o arcabouço também foi parcialmente mantido e ocorreram focos de preenchimento celular, indicando a formação de tecido conjuntivo frouxo. Adicionalmente, nos implantes de biomaterial com OC-CTMs e HMVECs houve manutenção parcial do arcabouço de colágeno do biomaterial com intenso preenchimento celular em seus poros, indicativos da formação de tecido conjuntivo frouxo a partir das células implantadas.

Desse modo, nota-se que o biomaterial não foi totalmente biodegradado após 57 dias de seu implante e que o protocolo em questão não proporcionou vascularização do novo tecido formado e formação de tecido ósseo com deposição mineral, processos importantes para a geração do nicho hematopoético heterotópico.

Esses resultados contribuíram para o estabelecimento de alterações no modelo de implante de CTMs. Assim, considerando que não houve vascularização apesar do implante de células endoteliais, adotamos o uso de células endoteliais de outra fonte no organismo e baseado na ausência de formação de tecido ósseo, foi proposta a utilização de um maior número de CTMs por implante e a adição de um indutor da osteogênese. Tais alterações foram realizadas para o estabelecimento do protocolo de implante 2.

Figura 20. Histologia dos organoides obtidos com o protocolo de implante 1 corados com hematoxilina e eosina. Em todos os grupos houve manutenção parcial do arcabouço de colágeno do biomaterial. Nos implantes com células ocorreu preenchimento celular com formação de tecido conjuntivo frouxo, principalmente no grupo experimental com OC-CTMs. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra: 100µm (imagens acima) e 20µm (imagens abaixo). Grupos experimentais: **GF**: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + HMVECs**: implante de biomaterial em conjunto com HMVECs; **GF + HMVECs + OC-CTMs**: implante de biomaterial com HMVECs e OC-CTMs.

4.9.2. Protocolo de implante 2

Informações sobre o peso dos animais obtido semanalmente após o implante com o protocolo 2 até o momento de sua retirada podem ser observadas na **figura 21**. Mais uma vez, não houve morte dos animais receptores durante o período de experimento e relevantes alterações nos pesos dos animais.

Figura 21. Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 2. n = 2 animais por grupo. **GF:** animal com implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVECs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

A fim de avaliar a formação de tecido ósseo no local do implante, foi realizado um exame radiológico com os animais 63 dias após o implante. As imagens obtidas com o exame estão presentes na **figura 22**. Não houve indícios de formação óssea no local do implante detectável pela técnica e é possível observar que não ocorreram diferenças entre os grupos experimentais.

Figura 22. Exame radiológico dos animais implantados com o protocolo 2 realizado após 63 dias. Não houve indícios de formação de tecido ósseo no local do implante. *animais que receberam apenas 1 implante, sendo este realizado no flanco direito. **GF:** animal com implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVECs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs:** animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

A análise macroscópica realizada no momento da retirada dos tecidos, 74 dias após o implante, mostrou que estes eram visíveis externamente, como é possível observar na **figura 23**. O tamanho do diâmetro dos tecidos foi em média 5,68 mm $\pm$ 0,68 mm e não variou significativamente entre os diferentes grupos experimentais. Lembrando que o biomaterial implantando apresentava 6,6 mm x 7,5 mm x 7 mm. A média dos tamanhos dos tecidos obtida em cada um dos grupos encontra-se na **tabela 2**.

Figura 23. Animais no momento da retirada dos organoides obtidos com o protocolo de implante 2. Os organoides eram visíveis externamente em todos os grupos experimentais. *animais que receberam apenas 1 implante, sendo este realizado no flanco direito. **GF**: animal com implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVECs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: animal com implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

Tabela 2. Tamanho dos organoides formados 74 dias após o implante realizado com o protocolo 2

Grupo experimental (número de implantes)	Média dos tamanhos (mm)	Desvio padrão
GF	5,90	0,23
GF+BMP4 (3)	6,20	0,68
GF+BMP4 + HUVECs (2)	5,32	0,26
GF+BMP4 + MO-CTMs (3)	5,84	0,45
GF+BMP4 + HUVECs+ MO-CTMs (3)	5,35	0,42
GF+BMP4 + OC-CTMs (3)	5,61	1,20
GF+BMP4 + HUVECs+ OC-CTMs (4)	5,29	0,47

Grupos experimentais: **GF**: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVEC; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

Adicionalmente, a análise macroscópica dos tecidos sugeriu a ocorrência de vascularização nos implantes com a presença de células endoteliais humanas da veia

umbilical (HUVECs), uma vez que apenas estes apresentaram coloração avermelhada, como pode ser observado na **figura 24**.

Figura 24. Organoides obtidos após 74 dias do implante com o protocolo 2. GF: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVECs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

Imagens obtidas com a análise histológica pela coloração com hematoxilina e eosina podem ser observadas na **figura 25** e com tricômico de Masson na **figura 26**. Ocorreu manutenção parcial do arcabouço de colágeno do biomaterial implantado em todos os grupos experimentais, assim como visto nos implantes com o protocolo 1, indicando que novamente o biomaterial não foi totalmente biodegradado. Também foi observado preenchimento celular nos poros do biomaterial, principalmente nos implantes com CTMs, sugerindo a presença das CTMs implantadas no organoide formado. Nos organoides derivados do implante de OC-CTMs foi observada uma região sugestiva para a formação de tecido ósseo, no entanto pelas análises realizadas a formação do tecido não foi confirmada. Essa região foi obtida nos organoides derivados de OC-CTMs isoladas de um dos animais doadores. A vascularização foi evidenciada pela análise histológica com a presença de vasos

sanguíneos no tecido formado. Assim, diferente do observado para os implantes com o protocolo 1, ocorreu a vascularização do organoide nos implantes com o protocolo 2, por meio da adição de HUVECs.

Figura 25. Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 2 corados com hematoxilina e eosina. É possível observar a formação de vasos sanguíneos (setas amarelas) principalmente nos implantes com HUVECs. Também ocorreu manutenção parcial do arcabouço de colágeno do biomaterial implantado e preenchimento celular nas regiões dos seus poros. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100 µm (imagens acima) e 10 µm (imagens abaixo). **GF**: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVEC; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

A coloração com tricômico de Masson evidenciou a presença de acúmulo de colágeno, corado em azul, na estrutura do biomaterial que se manteve presente nos organoides formados em todos os grupos experimentais.

Figura 26. Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 2 corados com tricômico de Masson. Coloração: tricômico de Masson. Barra = 100 µm (imagens acima) e 10 µm (imagens abaixo). **GF**: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVEC; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs.

A análise imunohistoquímica demonstrou a presença de células positivas para fosfatase-alcalina principalmente nos implantes com OC-CTMs, nas regiões sugestivas para formação de tecido ósseo, como pode ser visto na **figura 27**.

Assim, foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais, de modo que os organoides derivados dos implantes com CTMs apresentaram maior preenchimento celular que os demais, os organoides obtidos com os implantes de OC-CTMs apresentaram regiões com morfologia diferenciada que demonstrou intensa presença de células positivas para fosfatase alcalina e os organoides gerados com os implantes com HUVECs apresentaram a formação de vasos sanguíneos.

As análises realizadas não confirmaram ou evidenciaram a formação de tecido ósseo maduro nos organoides, apesar da região sugestiva encontrada nos implantes com OC-CTMs. Dentre os resultados obtidos com esse protocolo, destaca-se a ocorrência de vascularização, que é importante para o estabelecimento do tecido ósseo em formação. Dessa forma, uma vez alcançada a vascularização com o implante de HUVECs, foram feitas modificações visando potencializar a formação óssea para o protocolo de implante 3.

Figura 27. Análise com imunohistoquímica dos organoides formados após o implante com o protocolo 2. Foi realizada a marcação para as células positivas para fosfatase alcalina. É possível observar células positivas para fosfatase alcalina principalmente nos implantes com OC-CTMs. Barra: 100 µm. **GF**: implante de biomaterial Gelfoam (controle); **GF + BMP-4**: implante de biomaterial contendo BMP-4 (controle); **GF + BMP-4 + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e HUVECs (controle); **GF + BMP-4 + MO-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e MO-CTMs; **GF + BMP-4 + MO-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, MO-CTMs e HUVEC; **GF + BMP-4 + OC-CTMs**: implante de biomaterial contendo BMP-4 e OC-CTMs; **GF + BMP-4 + OC-CTMs + HUVECs**: implante de biomaterial contendo BMP-4, OC-CTMs e HUVECs. **Ct**: controle.

4.9.3. Protocolo de implante 3

Na tentativa de estabelecimento de um novo protocolo de implante para a formação de nicho hematopoético heterotópico, com base em demais protocolos bem estabelecidos e disponíveis na literatura (REINISCH *et al.*, 2015) foi utilizado matrigel para dar suporte às células. Além disso, grânulos de hidroxiapatita (HA) foram adicionados a fim de induzir a diferenciação osteogênica das CTMs implantadas, baseando-se também em protocolos previamente descritos (ABARRATEGI *et al.*, 2018; REINISCH *et al.*, 2015).

A **figura 28** traz informações do peso dos animais obtido semanalmente durante o período de experimento com o protocolo de implante 3 e, mais uma vez, não ocorreu morte dos animais receptores e variações de peso consideráveis.

Figura 28. Peso dos animais durante o período em que foram mantidos com os implantes realizados com o protocolo 3. n = 3 - 4 animais por grupo. **Matrigel + HA + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

O exame radiológico realizado com os animais 29 dias após não forneceu indícios de calcificação no local do implante na maioria dos animais avaliados. Em apenas um dos animais, receptor do implante de matrigel com HA, HUVECs e MO-CTMs, foi observada uma região sugestiva para presença de material calcificado no local do implante detectável pela técnica (**figura 29**). É importante considerar que este resultado pode ser decorrente da presença de HA no local e não necessariamente indicativo de tecido ósseo derivado das CTMs implantadas.

Figura 29. Exame radiológico dos animais implantados com o protocolo 3 realizado após 29 dias. A seta em amarelo indica região sugestiva para presença de material calcificado. *animais que receberam apenas 1 implante, sendo este realizado no flanco direito. **Matrigel + HA + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

A análise macroscópica realizada no momento de retirada do tecido, que ocorreu 76 dias após o implante, mostrou que, diferente do observado para os implantes com o protocolo 2 onde foi utilizado biomaterial, os organoides originados do implante com matrigel não eram visíveis externamente, como pode ser observado na **figura 30**.

O tamanho do maior diâmetro dos organoides foi em média $6,33 \text{ mm} \pm 1,11 \text{ mm}$ e não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais. A média dos tamanhos obtida em cada um dos grupos está exposta na **tabela 3**.

Figura 30. Animais no momento da retirada dos organoides obtidos com o protocolo de implante 3. Os organoides não eram visíveis externamente. *animais que receberam apenas 1 implante, sendo este realizado no flanco direito. **Matrigel + HA + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** animal com implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

Tabela 3. Tamanho dos organoides formados 76 dias após o implante realizado com o protocolo 3

Grupo experimental (número de implantes)	Média dos tamanhos (mm)	Desvio padrão
Matrigel + HA + HUVECs (3)	6,66	1,52
Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs (7)	6,0	1,15
Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs (8)	6,5	1,06

Matrigel + HA + HUVECs implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

Outra diferença encontrada em comparação ao implante com o protocolo 2 foi com relação à coloração avermelhada dos organoides derivados dos implantes com HUVECs, uma vez que os organoides aqui obtidos foram predominantemente brancos ou com coloração clara, independente do grupo experimental. No entanto, em casos específicos foram observadas regiões avermelhadas indicativas de vascularização no tecido, como demonstrado na **figura 31**.

Figura 31. Organoides obtidos após 76 dias do implante com o protocolo 3. Matrigel + HA + HUVECs: implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs** implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

Imagens obtidas com a histologia dos organoides com coloração com hematoxilina e eosina estão apresentadas na **figura 32** e com tricômico de Masson na **figura 33**. É possível observar que nos organoides derivados dos implantes de matrigel, grânulos de HA e HUVECs ocorreu pouco preenchimento celular e não ocorreu a formação de tecido ósseo. Nos organoides formados com os implantes de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs ocorreu maior preenchimento celular, porém sem a formação de um microambiente medular. Em um dos organoides obtido com o implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs houve preenchimento celular, com clara formação de tecido ósseo e medula óssea, indicando a formação do nicho hematopoético heterotópico, como pode ser melhor observado na **figura 32 B**. A coloração com tricômico de Masson também evidenciou o acúmulo de colágeno nos organoides, corado em azul, indicativo de formação de tecido ósseo. Assim, o protocolo de implante 3 com o uso de OC-CTMs foi eficiente para a geração de nicho hematopoético.

Adicionalmente, a marcação com imunohistoquímica mostrou a presença de células positivas para fosfatase alcalina principalmente no organoide derivado do implante de OC-CTMs, como é possível observar na **figura 34**. Esse resultado reforça a formação de tecido ósseo nesse organoide.

B NICHO HEMATOPOÉTICO HETEROTÓPICO

Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs

Figura 32. Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 3 corados com hematoxilina e eosina. A. Organoides formados nos 3 grupos experimentais. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 100 µm (imagens acima) e 10 µm (imagens abaixo). **Matrigel + HA + HUVECs:** implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs. **B.** Formação de nicho hematopoético heterotópico a partir do implante de matrigel com grânulos de HA, OC-CTMs e HUVECs. Houve formação de tecido ósseo e medula óssea, evidenciados nas imagens. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra = 10 µm (imagem à esquerda) e 5 µm (imagem à direita).

Figura 33. Histologia dos organoides formados com o protocolo de implante 3 corados com tricômico de Masson. Coloração: tricômico de Masson. Barra = 100 µm (imagens acima) e 10 µm (imagens abaixo). **Matrigel + HA + HUVECs:** implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs.

Figura 34. Análise com imunohistoquímica dos organoides formados após o implante com o protocolo 3. Foi realizada a marcação para as células positivas para fosfatase-alcalina. É possível observar células positivas para fosfatase alcalina principalmente no nicho hematopoético heterotópico formado no implante de OC-CTMs. Barra = 100 µm. **Matrigel + HA + HUVECs:** implante de matrigel, HA e HUVECs (controle). **Matrigel + HA + MO-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, MO-CTMs e HUVECs. **Matrigel + HA + OC-CTMs + HUVECs:** implante de matrigel, HA, OC-CTMs e HUVECs. **Ct:** controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, caracterizamos CTMs isoladas da medula óssea, as quais já são amplamente descritas (revisado em BIANCO *et al.*, 2001; TROPEL *et al.*, 2004), e do osso compacto, com base na hipótese da existência de duas populações distintas de CTMs no microambiente da medula óssea (WORTHLEY *et al.*, 2015; KASSEM; BIANCO, 2015). Assim, observamos diferenças entre características apresentadas pelas populações de CTMs de ambas as fontes e obtivemos um nicho hematopoético heterotópico a partir do seu implante. Conhecer melhor a biologia e funcionalidade das CTMs presentes na medula óssea contribui para o entendimento da importância dessas células para este microambiente. Definir as características de cada uma das populações de CTMs presentes no nicho hematopoético pode fornecer critérios de seleção da população celular adequada para a terapia celular. Além disso, a geração do nicho hematopoético heterotópico representa uma ferramenta de estudos, que pode ser manipulável a fim de avaliar a função dos demais componentes do nicho hematopoético para a sua manutenção.

Foi possível obter células aderentes ao plástico capazes de formar colônias após o processamento das amostras do osso compacto, garantindo o sucesso no isolamento de CTMs a partir dessa fonte. Já são descritos diferentes protocolos de isolamento de CTMs a partir do osso compacto (GUO *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2015) na tentativa de fornecer uma fonte de isolamento alternativa de CTMs murinas diante da baixa frequência dessas células na medula óssea e elevada contaminação por células hematopoéticas nas culturas celulares. Esses trabalhos têm demonstrado que as CTMs obtidas a partir do plaqueamento das células isoladas do osso compacto ou do plaqueamento de fragmentos ósseos com ou sem a digestão enzimática apresentam características típicas de CTMs da medula óssea previamente definidas. Assim, o osso compacto é apontado como fonte promissora para obtenção de CTMs, uma vez que proporcionou menor contaminação por células hematopoéticas e maior rendimento celular em comparação com a medula óssea (ZHU *et al.*, 2010).

A contagem de células realizada logo após o isolamento mostrou que a partir das amostras da medula óssea foi obtido um número total maior de células isoladas em relação ao osso compacto. A região perivascular da medula óssea é composta por diversos tipos celulares como progenitores celulares linfóides e mielóides, células

maduras, CTHs, fibroblastos, macrófagos, adipócitos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, além das CTMs (revisado em BOULAIS; FRENETTE, 2015). Estas diversas células, podem ser isoladas juntamente com as CTMs após a realização do *flushing* da medula óssea. Por outro lado, o osso compacto é composto principalmente por células de linhagem osteogênica e células endoteliais. Adicionalmente, a digestão em collagenase realizada com as amostras do osso compacto pode contribuir para a eliminação das demais células que tenham sido isoladas juntamente com as CTMs. Então, a maior celularidade e heterogeneidade celular apresentada pela medula óssea pode justificar o elevado número de células isoladas a partir dessa fonte.

Após o isolamento das células, espera-se que o cultivo em condições adequadas proporcione a seleção das CTMs. Assim, foram obtidas colônias a partir das células aderentes isoladas da medula óssea e do osso compacto, confirmando duas características típicas das CTMs, a aderência à superfície da garrafa de cultivo celular e a capacidade de formar colônias. Então, 15 dias após o isolamento das células, a frequência de CFU-F para a medula óssea foi 0,0003% e para o osso compacto 0,008%. Foi observado que das células nucleadas obtidas a partir da medula óssea de camundongos adultos, de 0,00003% a 0,00008% correspondem a CTMs (MEIRELLES; NARDI, 2003)

Para as amostras do osso compacto foi possível observar uma maior frequência de CFU-F com relação à medula óssea, reforçando que o osso compacto pode ser uma fonte promissora para o isolamento de CTMs. Esse resultado pode ser decorrente da maior heterogeneidade celular encontrada na medula óssea. Foi relatado que das células provenientes do plaqueamento de fragmentos ósseos obteve-se maior número de colônias em comparação com as amostras da medula óssea (CAI *et al.*, 2015).

As CTMs isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide. Em geral, as MO-CTMs apresentaram maior relação citoplasma/núcleo, enquanto as OC-CTMs eram menores, porém essa característica não foi encontrada de maneira uniforme nas populações de células avaliadas e não representa um critério para identificação de CTMs de cada uma das fontes. É descrito que as CTMs podem representar uma população celular de morfologia heterogênea, contendo células arredondadas, fusiformes e achatadas (MEIRELLES; NARDI, 2003).

Com relação ao perfil imunofenotípico, observamos que os marcadores de superfície Sca-1, CD90.2, CD44 e CD29 eram expressos por grande parte das células

que compunham as populações de MO-CTMs e OC-CTMs. Não há definido um marcador de superfície específico para as CTMs e, no caso das CTMs murinas, estes marcadores são os comumente utilizados para a caracterização das células isoladas da medula óssea (MEIRELLES; NARDI, 2003; SUN *et al.*, 2003), bem como para as CTMs obtidas do osso compacto (SUNG *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2015). A expressão do marcador de superfície Sca-1, que é típico das células-tronco, por CTMs murinas obtidas da medula óssea e de osso longos foi relacionada com a maior frequência de CFU-F e capacidade de proliferação nessas células (BAUSTIAN; HANLEY; CEREDIG, 2015). Assim, observamos que as CTMs estudadas apresentaram o perfil imunofenotípico esperado com relação a tais marcadores de superfície.

Comparando as duas populações de CTMs, encontramos diferenças com relação ao número de células positivas para CD44, de modo que a população de OC-CTMs apresentou resultados aproximadamente 1,5 vezes maiores que a de MO-CTMs. O marcador de superfície CD44 é comumente utilizado para caracterização de CTMs murinas e já foi observado que a porcentagem de células positivas para CD44 aumenta após a 3ª passagem em populações de CTMs isoladas da medula óssea e do osso compacto de camundongos (BAUSTIAN; HANLEY; CEREDIG, 2015). Adicionalmente, é importante considerar que sugere-se que a expressão de CD44 pelas CTMs seja uma característica adquirida após cultivo *in vitro*, uma vez que essas células também podem ser obtidas de populações celulares negativas para tal marcador de superfície (QIAN; BLANC; SIGVARDSSON, 2012).

As populações de CTMs não apresentaram contaminação significativa por células endoteliais (CD31⁺) e células progenitoras hematopoéticas (CD117⁺). Esses resultados sugerem que as condições de cultivo utilizadas não proporcionaram o estabelecimento e proliferação de tais tipos celulares, assim como esperado e demonstrado em demais estudos (BADDIO *et al.*, 2003; MEIRELLES; NARDI, 2003), contribuindo para a seleção das CTMs e pureza das populações celulares.

No entanto, observamos contaminação significativa por células hematopoéticas (CD45⁺) na população de MO-CTMs. A contaminação por este tipo celular é comum em culturas de CTMs provenientes da medula óssea de camundongos, visto que mesmo após diversas passagens, as células hematopoéticas podem permanecer no cultivo (ANJOS AFONSO, 2004). Como já mencionado, na tentativa de um protocolo de isolamento que proporcione menor contaminação por essas células, o osso compacto é apontado como fonte alternativa para a obtenção das CTMs.

As CTMs também foram capazes de acumular vesículas lipídicas após induzidas *in vitro*, confirmando mais uma característica utilizada como critério para definição dessas células. A hipótese da existência de populações de CTMs distintas no microambiente da medula óssea se baseia em estudos que demonstraram que as CTMs isoladas do endósteo não apresentaram capacidade de diferenciação adipogênica (CHAN *et al.*, 2015; WORTHLEY *et al.*, 2015), diferente do descrito para CTMs da medula óssea. No entanto, não encontramos diferenças entre as MO-CTMs e OC-CTMs quanto à adipogênese. A capacidade de diferenciação adipogênica de CTMs isoladas do osso compacto também já foi previamente descrita (MITRA *et al.*, 2015).

Porém, as MO-CTMs demonstraram baixa capacidade de diferenciação osteogênica, uma vez que a maioria das populações de MO-CTMs não demonstraram potencial osteogênico. Assim, apesar de não terem sido encontradas diferenças entre as duas populações de CTMs com a quantificação da diferenciação osteogênica, as OC-CTMs apresentaram maior taxa de populações capazes de secretar matriz extracelular calcificada. Seguindo a hipótese de que as CTMs presentes no endósteo desempenham importante papel no estabelecimento dos tecidos esqueléticos durante a fase de desenvolvimento do indivíduo, esperávamos que as OC-CTMs apresentassem maior potencial osteogênico.

Também nos questionamos se genes relacionados à osteogênese e manutenção do nicho hematopoético seriam diferencialmente expressos entre MO-CTMs e OC-CTMs, uma vez que essas células podem apresentar diferentes funcionalidades em seu microambiente. Os genes *Runx2* (BYERS *et al.*, 2002), *Spp1* (CHEN *et al.*, 2014) e *Dlx6* (revisado em FRITH; GENEVER, 2008) desempenham importante papel na diferenciação osteogênica. Adicionalmente, foi visto que *Cxcl12* é fundamental para a hematopoese normal, uma vez que a sua deleção em CTMs murinas causou uma redução de CTHs, indicando sua atuação na regulação dessas células (GREENBAUM *et al.*, 2013). Além disso, sugere-se que a expressão de *Vcam1* está relacionada com a manutenção das CTHs (MENDÉZ FERRER *et al.*, 2010). No entanto, não encontramos diferenças na expressão de tais genes entre as duas populações estudadas e cultivadas na condição de hipóxia.

Um dos pontos observados com relação aos nossos resultados de caracterização das CTMs foi a variação entre as populações celulares obtidas da mesma fonte e de diferentes animais doadores. Quando cultivadas, as CTMs

representam populações heterogêneas de células progenitoras multipotentes e aderentes que podem apresentar diferentes potenciais de diferenciação (revisado em LONG, 2001). Assim, poderíamos especular a respeito da variação entre indivíduos relacionando-a com a heterogeneidade celular presente nas populações de CTMs. Em populações celulares obtidas de animais distintos, clones com características diferentes podem ter apresentado maior potencial proliferativo e, após diversas passagens, representar a maior parte da população.

As condições de cultivo celular são diferentes das encontradas no organismo e, portanto, podem influenciar o comportamento das células e alterar suas características. Em geral, na medula óssea a concentração de oxigênio é entre 3% a 7%, podendo apresentar concentrações de até 1% em determinadas regiões (revisado em MA *et al.*, 2009). Assim, na tentativa de recapitular o microambiente da medula óssea, que apresenta baixas concentrações de oxigênio, adotamos o cultivo celular em hipóxia (5% O₂). Já foi demonstrado que o cultivo de CTMs murinas provenientes da medula óssea em hipóxia proporcionou a formação de maior número de colônias, com maiores tamanho e densidade celular com relação ao cultivo em normóxia (CAROTI *et al.*, 2017). Nesse contexto, a tensão de oxigênio é considerada um estímulo presente no microambiente do nicho hematopoético que contribui para a regulação da proliferação e diferenciação das células-tronco (revisado em MA *et al.*, 2009).

No entanto, nos questionamos se o cultivo das CTMs nessa condição nos proporcionou resultados diferentes dos comumente obtidos na condição de cultivo em normóxia (21% O₂). Desse modo, realizamos testes de comparação entre as CTMs cultivadas em tais condições com relação à capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*, proliferação celular e expressão gênica. É importante ressaltar que todas as CTMs foram inicialmente cultivadas em hipóxia e, especificamente durante os experimentos listados, um grupo de células foi transferido para o cultivo em normóxia.

Assim, nossos dados mostraram que a alteração da concentração de oxigênio não derivou em modificações no potencial proliferativo e capacidade de diferenciação osteogênica das CTMs. Lembrando que o tempo de cultivo nas diferentes condições pode não ter sido o suficiente para evidenciar a influência da concentração de oxigênio na proliferação das células. Comparações entre CTMs murinas da medula óssea cultivadas em ambas condições logo após o isolamento mostrou que o cultivo em

hipóxia promove aumento na capacidade proliferativa dessas células (CAROTI *et al.*, 2017).

Porém, em nossos testes, o cultivo em normóxia ocasionou o aumento na capacidade de diferenciação adipogênica das populações de MO-CTMs e na expressão do gene *Vcam1* pelas OC-CTMs. Além disso, quando cultivadas em normóxia, as MO-CTMs e OC-CTMs apresentaram diferente expressão de *Runx-2*, que foi mais expresso pelas MO-CTMs.

Sugere-se que o cultivo em hipóxia promove um estado indiferenciado para as células-tronco (revisado em IVANOVIC, 2009). Sabe-se também que a concentração de oxigênio interfere na adipogênese, de modo que foi observado que a redução na respiração mitocondrial reduziu a diferenciação adipogênica em CTMs humanas (revisado em POULOS *et al.*, 2015). Nesse contexto, a indução da diferenciação adipogênica em condição de normóxia pode justificar a melhora na adipogênese apresentada pelas CTMs. Com relação à expressão de *Vcam1*, foi visto que o cultivo em alta densidade celular de CTMs humanas da medula óssea favorece a expressão do gene e inibe a capacidade de migração das células (NISHIHARA *et al.*, 2011).

Apesar da tentativa de aproximar as condições de cultivo celular daquelas encontradas no organismo, uma caracterização fidedigna das células representa um desafio diante da complexibilidade no microambiente em que elas ocorrem. Assim, os experimentos *in vivo* ganham destaque e são considerados modelos de estudo mais representativos da realidade. Dessa forma, para complementar a caracterização e comparação das duas populações de CTMs estudadas, avaliamos as CTMs com relação à capacidade de originar um nicho hematopoético heterotópico após implantadas em animais.

Para o estabelecimento do protocolo de implante de CTMs com a finalidade de geração do nicho hematopoético heterotópico foram avaliados três diferentes protocolos, com base principalmente na presença de vascularização, formação de tecido ósseo e geração de nicho hematopoético. No primeiro protocolo, avaliamos o implante de OC-CTMs, as quais apresentaram maior taxa de diferenciação osteogênica *in vitro*, em conjunto com HMVECs em biomaterial. Nossos resultados mostraram que não ocorreu vascularização do organoide, apesar do implante em conjunto com células endoteliais, e formação de tecido ósseo. Assim, nota-se que as HMVECs não foram capazes de proporcionar a formação de vasos sanguíneos no

tecido formado. Essas células já foram previamente utilizadas para a geração de organoides *in vitro* (revisado em HERRON; HANSEN; ABACI, 2019).

Foi observado também que o biomaterial implantado não foi totalmente biodegradado e, portanto, parte de sua estrutura de colágeno ainda estava presente nos organoides. Os biomateriais para formação de tecido ósseo são utilizados em implantes a fim de fornecer uma estrutura tridimensional para o estabelecimento, crescimento e diferenciação das células. Além disso, devem ser escolhidos de acordo com as características apresentadas pelo tecido a ser mimetizado (revisado em PENNESI *et al.*, 2011). No caso do tecido ósseo, uma das características estruturais marcantes é a porosidade. O biomaterial Gelfoam já foi usado para a geração de nicho hematopoético heterotópico em conjunto com CTMs e sua utilização no implante proporcionou o estabelecimento de tal microambiente (PASSARO *et al.*, 2017).

No segundo protocolo, observamos que o implante de maior quantidade de CTMs, sua permanência nos animais por mais tempo e a adição de BMP-4 proporcionaram maior preenchimento celular nos organoides, principalmente naqueles derivados do implante de CTMs. Adicionalmente, a adição de HUVECs promoveu a vascularização do organoide. O sucesso no uso de HUVECs em associação com CTMs visando à vascularização do novo tecido formado e formação de nicho hematopoético heterotópico já é descrito (PASSARO *et al.*, 2017) e estas são células comumente utilizadas para a vascularização de organoides visando à formação óssea (revisado em HERRON; HANSEN; ABACI, 2019).

O BMP-4 foi utilizado a fim de induzir a diferenciação das CTMs implantadas. O BMP é um indutor osteogênico também amplamente usado para formação de tecido ósseo *in vivo*. Desempenha importante papel em diferentes etapas do desenvolvimento ósseo, é necessário para a diferenciação das CTMs em células osteocondroprogenitoras e está envolvido no controle da ossificação endocondral (revisado em BEEDERMAN *et al.*, 2013).

Apesar de nossas análises não terem fornecido indícios diretos de formação de nicho hematopoético heterotópico, mesmo com o uso de BMP-4, foi observada a presença de células positivas para fosfatase alcalina, principalmente nos organoides derivados do implante de OC-CTMs. A fosfatase alcalina é um marcador osteogênico comumente utilizado como indicativo de diferenciação osteogênica (revisado em HOEMANN; EL-GABALAWY; MCKEE, 2009). Foi demonstrado que a subpopulação de células positivas para fosfatase alcalina obtidas de ossos de ratos contem

osteoprogenitores com capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro*, enquanto a subpopulação negativa para tal marcador é composta por osteoprogenitores que necessitam de indutores para se diferenciarem (TURKSEN; AUBIN, 1991). A ocorrência de células positivas para fosfatase alcalina nos organoides pode sugerir que, apesar de não ter sido observada típica formação óssea, as células poderiam estar em diferenciação e, assim, o tecido ósseo em desenvolvimento.

No terceiro protocolo, avaliamos o uso de matrigel nos implantes para a formação do nicho hematopoético. Foi relatado que o uso de matrigel como suporte para as células durante o implante leva à uma eficiente formação óssea e medular ectópica (REINISCH *et al.*, 2015). Como as HUVECs promoveram a vascularização do tecido no protocolo anterior, mais uma vez foram implantadas em conjunto com as CTMs. Também foram adicionados grânulos de HA como osteoindutores baseado em protocolos já descritos (REINISCH *et al.*, 2015).

Assim, foi visto que o implante de matrigel, OC-CTMs, HUVECs e grânulos de HA proporcionou a geração de um nicho hematopoético heterotópico. Este era composto por tecido ósseo e um microambiente medular. Além disso, o organoide com formação de um microambiente medular apresentou intenso preenchimento celular com células positivas para fosfatase alcalina, reforçando a formação de tecido ósseo.

Nossos resultados demonstraram diferenças entre as MO-CTMs e OC-CTMs com relação às características *in vitro* e capacidade de formação de nicho hematopoético heterotópico. Ademais, demonstramos que as CTMs murinas isoladas do osso compacto também apresentam a capacidade de formar o nicho hematopoético *in vivo* após serem implantadas, como previamente demonstrado para CTMs obtidas da medula óssea (SACCHETTI *et al.*, 2007; REINISCH *et al.*, 2015; PASSARO *et al.*, 2017).

O estabelecimento do nicho hematopoético heterotópico permite sua aplicação como ferramenta para avaliar as características e funções das diversas células que o compõe. Nesse contexto, além de caracterizar e comparar CTMs murinas isoladas da medula óssea e do osso compacto, esta dissertação proporcionou uma ferramenta que pode contribuir para futuras pesquisas de caracterização dos demais componentes do nicho hematopoético.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- As populações de MO-CTMs e OC-CTMs apresentaram diferenças com relação ao potencial clonogênico, capacidade de diferenciação, perfil imunofenotípico e expressão gênica, corroborando com a hipótese de que podem representar populações distintas de CTMs na medula óssea.

- O osso compacto pode ser considerado uma fonte promissora para a obtenção de CTMs.

- Com relação à caracterização *in vivo*, foi estabelecido um protocolo de implante capaz de promover a formação de nicho hematopoético heterotópico a partir das OC-CTMs. O estabelecimento de um microambiente artificial, permite sua aplicação como ferramenta na avaliação da funcionalidade dos componentes celulares do nicho hematopoético, representando oportunidades para diferentes pesquisas.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARRATEGI, A. *et al.* Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 215, n. 3, p.729-743, 2018. Rockefeller University Press. doi: 10.1084/jem.20172139.

ANJOS-AFONSO, F. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. **Journal Of Cell Science**, v. 117, n. 23, p.5655-5664, 2004. The Company of Biologists. doi: 10.1242/jcs.01488.

ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P. S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. **International Journal Of Hematology**, v. 106, n. 1, p.45-54, 2017. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1007/s12185-017-2262-9.

BADDOO, M. *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 89, n. 6, p.1235-1249, 2003. Wiley. doi: 10.1002/jcb.10594.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p.1384-1392, 2007. Wiley. doi: 10.1634/stemcells.2006-0709.

BAUSTIAN, C.; HANLEY, S.; CEREDIG, R. Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, 2015. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1186/s13287-015-0139-5.

BEEDERMAN, M. *et al.* BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. **Journal Of Biomedical Science And Engineering**, v. 06, n. 08, p.32-52, 2013. Scientific Research Publishing, Inc. doi: 10.4236/jbise.2013.68a1004.

BIANCO, P. *et al.* Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p.180-192, 2001. Wiley. doi: 10.1634/stemcells.19-3-180.

BOULAIS, P. E.; FRENETTE, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. **Blood**, v. 125, n. 17, p.2621-2629, 2015. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2014-09-570192.

BRUDER, S. P. *et al.* Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. **Journal Of Orthopaedic Research**, v. 16, n. 2, p.155-162, 1998. Wiley. doi: 10.1002/jor.1100160202.

BRUNS, I. *et al.* Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p.1315-1320, 2014. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nm.3707.

BUTLER, J. M. *et al.* Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p.251-264, 2010. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.stem.2010.02.001.

BYERS, B. A. *et al.* Cell-Type-Dependent Up-Regulation of *In Vitro* Mineralization After Overexpression of the Osteoblast-Specific Transcription Factor Runx2/Cbfa1. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 17, n. 11, p.1931-1944, 2002. Wiley. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.11.1931.

CAI, Y. *et al.* Comparisons of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Primary Adherent Culture of Compact Bone Fragments and Whole Bone Marrow. **Stem Cells International**, v. 2015, p.1-8, 2015. Hindawi Limited. doi: 10.1155/2015/708906.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal Of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p.641-650, 1991. Wiley. doi: 10.1002/jor.1100090504.

CAROTI, C. M. *et al.* A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained Multipotency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/s41598-017-13477-y.

CHAN, C. K. F. *et al.* Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. **Nature**, v. 457, n. 7228, p.490-494, 2009. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature07547.

CHAN, C. K.F. *et al.* Identification and Specification of the Mouse Skeletal Stem Cell. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p.285-298, 2015. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.002.

CHEN, Q. *et al.* An Osteopontin-Integrin Interaction Plays a Critical Role in Directing Adipogenesis and Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 2, p.327-337, 2014. Wiley. doi: 10.1002/stem.1567.

CHOW, A. *et al.* Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 208, n. 2, p.261-271, 2011. Rockefeller University Press. doi: 10.1084/jem.20101688.

COVAS, D. T. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 5, p.642-654, 2008. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.exphem.2007.12.015.

CRANE, G. M.; JEFFERY, E.; MORRISON, S. J. Adult haematopoietic stem cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p.573-590, 2017. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nri.2017.53.

CRISAN, M. *et al.* A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p.301-313, 2008. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.

DING, L. *et al.* Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 481, n. 7382, p.457-462, 2012. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature10783.

DING, L.; MORRISON, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, v. 495, n. 7440, p.231-235, 2013. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature11885.

DOMINICI, M. *et al.* 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. Elsevier BV. doi: 10.1080/14653240600855905.

FERREIRA, M. S. Ventura *et al.* An engineered multicomponent bone marrow niche for the recapitulation of hematopoiesis at ectopic transplantation sites. **Journal Of Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, 2016. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1186/s13045-016-0234-9.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p.393-403, 1970. Wiley. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

FRIEDENSTEIN, A. J. Osteogenic stem cells in bone marrow. *In Bone and Mineral Research*, J.N.M. Heersche e J.A. Kanis, eds. Amsterdam: Elsevier. 243–272, 1990.

FRITH, J.; GENEVER, P. Transcriptional Control of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. **Transfusion Medicine And Hemotherapy**, v. 35, n. 3, p.216-227, 2008. S. Karger AG. doi: 10.1159/000127448.

GREENBAUM, A. *et al.* CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. **Nature**, v. 495, n. 7440, p.227-230, 2013. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature11926.

GUARNERIO, J. *et al.* Bone Marrow Endosteal Mesenchymal Progenitors Depend on HIF Factors for Maintenance and Regulation of Hematopoiesis. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 6, p.794-809, 2014. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.002.

GUO, Z. *et al.* In Vitro Characteristics and In Vivo Immunosuppressive Activity of Compact Bone-Derived Murine Mesenchymal Progenitor Cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 4, p.992-1000, 2006. Wiley. doi:10.1634/stemcells.2005-0224.

HERRON, L. A.; HANSEN, C. S.; ABACI, H. E. Engineering tissue-specific blood vessels. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 4, n. 3, 2019. Wiley. doi: 10.1002/btm2.10139.

HOEMANN, C.D.; EL-GABALAWY, H.; MCKEE, M.D. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 4, p.318-323, 2009. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.patbio.2008.06.004.

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis *in vivo*. **Biomaterials**, v. 61, p.103-114, 2015. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.057.

HUANG, X. *et al.* Three-dimensional co-culture of mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis *in vitro*: Functional implication of the biomimetic HSC niche. **International Journal Of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p.1141-1151, 2016. Spandidos Publications. doi: 10.3892/ijmm.2016.2712.

ITKIN, T. *et al.* Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. **Nature**, v. 532, n. 7599, p.323-328, 2016. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature17624.

IVANOVIC, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p.271-275, 2009. Wiley. doi: 10.1002/jcp.21690.

KASSEM, M.; BIANCO, P. Skeletal Stem Cells in Space and Time. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p.17-19, 2015. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.034.

KIM, J. *et al.* Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 10, p.1830-1837, 2007. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.050.

KIMURA, Y. *et al.* C-Kit-Mediated Functional Positioning of Stem Cells to Their Niches Is Essential for Maintenance and Regeneration of Adult Hematopoiesis. **Plos One**, v. 6, n. 10, 2011. Public Library of Science (PLoS). doi: 10.1371/journal.pone.0026918.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 3, p.232-242, 2006. Wiley. doi: 10.1111/j.1532-950x.2006.00142.x.

LONG, Michael W. Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, v. 27, n. 3, p.677-690, 2001. Elsevier BV. doi: 10.1006/bcmd.2001.0431.

MA, T. *et al.* Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 1, p.32-42, 2009. Wiley. doi: 10.1002/btpr.128.

MAES, C. Role and Regulation of Vascularization Processes in Endochondral Bones. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 4, p.307-323, 2013. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1007/s00223-012-9689-z.

MEIRELLES, L. da S.; NARDI, N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. **British Journal Of Haematology**, v. 123, n. 4, p.702-711, 2003. Wiley. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04669.x.

MEIRELLES, L. da S. *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5-6, p.419-427, 2009. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.

MÉNDEZ-FERRER, S. *et al.* Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. **Nature**, v. 452, n. 7186, p.442-447, 2008. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature06685.

MÉNDEZ-FERRER, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p.829-834, 2010. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature09262.

MITRA, N.K. *et al.* Investigating Cell Surface Markers and Differentiation Potential of Compact Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells. **International Journal Of Stem Cell Research And Transplantation**, p.91-95, 2015. SciDoc Publishers LLC. doi: 10.19070/2328-3548-1500015.

MOHYELDIN, A.; GARZÓN-MUVDI, T.; QUIÑONES-HINOJOSA, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2, p.150-161, 2010. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007.

MORIKAWA, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 206, n. 11, p.2483-2496, 2009. Rockefeller University Press. doi: 10.1084/jem.20091046.

NADRI, S. *et al.* An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. **The International Journal Of Developmental Biology**, v. 51, n. 8, p.723-729, 2007. UPV/EHU Press. doi: 10.1387/ijdb.072352ns.

NAKAMURA, Y. *et al.* Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 116, n. 9, p.1422-1432, 2010. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2009-08-239194.

NAVEIRAS, O. *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. **Nature**, v. 460, n. 7252, p.259-263, 2009. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature08099.

NISHIHARA, S. *et al.* High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 35, n. 5, p.475-481, 2011. Wiley. doi: 10.1042/cbi20100372.

PASSARO, D. *et al.* Bioengineering of Humanized Bone Marrow Microenvironments in Mouse and Their Visualization by Live Imaging. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 126, 2017. MyJove Corporation. doi: 10.3791/55914.

PENNESI, G. *et al.* Regulatory Influence of Scaffolds on Cell Behavior: How Cells Decode Biomaterials. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 2, p.151-159, 2011. Bentham Science Publishers Ltd. doi: 10.2174/138920111794295684.

POULOS, S. P. *et al.* The increasingly complex regulation of adipocyte differentiation. **Experimental Biology And Medicine**, v. 241, n. 5, p.449-456, 2015. SAGE Publications. doi: 10.1177/1535370215619041.

QIAN, H.; BLANC, K. L.; SIGVARDSSON, M. Primary Mesenchymal Stem and Progenitor Cells from Bone Marrow Lack Expression of CD44 Protein. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 287, n. 31, p.25795-25807, 2012. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). doi: 10.1074/jbc.m112.339622.

QIN, Y. *et al.* Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation *in vitro* and promote bone regeneration *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/srep21961.

REINISCH, A. *et al.* Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. **Blood**, v. 125, n. 2, p.249-260, 2015. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2014-04-572255.

SACCHETTI, B. *et al.* Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, v. 131, n. 2, p.324-336, 2007. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.025.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**. 4, 7-25. 1978.

SCOTT, M. A. *et al.* Brief Review of Models of Ectopic Bone Formation. **Stem Cells And Development**, v. 21, n. 5, p.655-667, 2012. Mary Ann Liebert Inc. doi: 10.1089/scd.2011.0517.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. **Journal Of Bone And Mineral Research**, v. 18, n. 4, p.696-704, 2003. Wiley. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.

SUDA, T.; TAKUBO, K.; SEMENZA, G. I. Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 4, p.298-310, 2011. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.stem.2011.09.010.

SUGIYAMA, T. *et al.* Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p.977-988, 2006. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.

SUN, S. *et al.* Isolation of Mouse Marrow Mesenchymal Progenitors by a Novel and Reliable Method. **Stem Cells**, v. 21, n. 5, p.527-535, 2003. Wiley. doi: 10.1634/stemcells.21-5-527.

SUNG, J.H. *et al.* Isolation and Characterization of Mouse Mesenchymal Stem Cells. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 8, p.2649-2654, 2008. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.08.009.

TAVASSOLI, M.; CROSBY, W. H. Transplantation of Marrow to Extramedullary Sites. **Science**, v. 161, n. 3836, p.54-56, 1968. American Association for the Advancement of Science (AAAS). doi: 10.1126/science.161.3836.54.

TORMIN, A. *et al.* CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. **Blood**, v. 117, n. 19, p.5067-5077, 2011. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2010-08-304287.

TROPEL, P. *et al.* Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, v. 295, n. 2, p.395-406, 2004. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.12.030.

TURKSEN, K.; AUBIN, J. E. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. **The Journal Of Cell Biology**, v. 114, n. 2, p.373-384, 1991. Rockefeller University Press. doi: 10.1083/jcb.114.2.373.

WAGNER, W. *et al.* Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p.1402-1416, 2005. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.

WEI, X. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 6, p.747-754, 2013. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/aps.2013.50.

WINKLER, I. G. *et al.* Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. **Nature Medicine**, v. 18, n. 11, p.1651-1657, 2012. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nm.2969.

WORTHLEY, D. I. *et al.* Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. **Cell**, v. 160, n. 1-2, p.269-284, 2015. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.042.

ZHANG, J. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 6960, p.836-841, 2003. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nature02041.

ZHU, H. *et al.* A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p.550-560, 2010. Springer Science and Business Media LLC. doi: 10.1038/nprot.2009.238.