**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCO-MAXILO-FACIAL E PERIODONTIA**

GILEADE PEREIRA FREITAS

**Efeito de Injeções Locais de Células-Tronco Mesenquimais ou
Osteoblastos na Regeneração do Tecido Ósseo**

“Versão Corrigida”

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

GILEADE PEREIRA FREITAS

**Efeito de Injeções Locais de Células-Tronco Mesenquimais ou
Osteoblastos na Regeneração do Tecido Ósseo**

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como
parte das exigências para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Freitas, Gileade Pereira

Efeito de injeções locais de células-tronco mesenquimais ou osteoblastos na regeneração do tecido ósseo. Ribeirão Preto, 2018.

131p.: il.; 30cm

"Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa"

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP. Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia) Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. Célula-tronco mesenquimal; 2. Osteoblasto; 3. Medula óssea; 4. Tecido adiposo; 5. Regeneração óssea; 6. Terapia celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FREITAS, GP. Efeito de injeções locais de células-tronco mesenquimais ou osteoblastos na regeneração do tecido ósseo

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como
parte das exigências para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Programa: Odontologia (Periodontia)
Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular, de Histologia, LAB 3D BIO, no Hemocentro de Ribeirão Preto, no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Department of Biomaterials and Biomimetics da New York University - NYU, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Bolsa de Doutorado (Processo nº 2014/26864-4) e Auxílio Regular à Pesquisa (Processo nº 2015/21439-6).

Dedicat6ria

Às minhas queridas avós
Laurita (in memoriam) e **Eda Gilda**.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Adalberto Luiz Rosa**, pela orientação, amizade e pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Ao **Professor Dr. Márcio Mateus Beloti**, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À **Professora Dra. Emanuela Prado Ferraz** pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos Professores de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: **Waldemar M. R. Barros, Cássio E. Sverzut, Samuel P. Xavier e Alexandre E. Trivellato** pelos conhecimentos transmitidos.

Ao **Professor Dr. Paulo G. Coelho** da Universidade de Nova Iorque pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos colaboradores docentes, **alunos e funcionários** do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo auxílio e dedicação nos experimentos envolvendo bioluminescência.

Às queridas funcionárias **Dulce, Rosângela, Daniela e Isabel** por estarem sempre dispostas a me ajudarem.

Aos funcionários e amigos **Roger, Fabíola, Adriana, Milla, Sebastião, Edson, Massaro e Rafael** pela paciência e dedicação, as quais foram muito importantes para a realização desse trabalho.

Aos colegas do curso de Doutorado em Cirurgia e Periodontia da FORP-USP: **Rafael, Felipe, Guilherme, Alann, Rodrigo e Paula Gabriela**, pela amizade e por muitas conversas compartilhadas.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro nas modalidades Bolsa de Doutorado (Processo nº 2014/26864-4) e Auxílio Regular à Pesquisa (Processo nº 2015/21439-6) durante a realização desse projeto.

Às minhas queridas avós, **Laurita** (*in memoriam*) e **Eda Gilda**, mulheres fortes e guerreiras. Vocês são meus exemplos de sabedoria.

À minha família, **Márcia, Marcos, Guilherme, Roberta, Benjamin, Sônia, Maíra, Bárbara, Vinícius, Iara, Isadora, Alneu, Carol, Heitor e Lígia**, pelo incentivo e carinho. Sem vocês tudo seria mais difícil.

À minha esposa, **Helena**. Pela amizade, carinho e horas me ajudando na realização desse sonho.

Muito obrigado.

Resumo

RESUMO

FREITAS, GP. **Efeito de Injeções Locais de Células-Tronco Mesenquimais ou Osteoblastos na Regeneração do Tecido Ósseo.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018. 131p.

O osso é um tecido com grande capacidade de regeneração, mas em algumas situações a extensão da injúria impede o reparo do tecido. Nesse cenário, a terapia celular tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa por ser uma alternativa promissora em relação aos tratamentos existentes. No entanto, muitos aspectos experimentais necessitam ser melhor investigados para tornar essa terapia um tratamento efetivo para a regeneração de defeitos do tecido ósseo. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de medula óssea (CTMs-MO) e de tecido adiposo (CTMs-TA), bem como de osteoblastos (OBs) diferenciados a partir dessas CTMs (OBs-MO e OBs-TA), para regenerar o tecido ósseo quando injetadas diretamente em defeitos de 5mm de diâmetro criados em calvárias de ratos. Para isso, as CTMs foram obtidas de medula óssea de fêmur e de tecido adiposo inguinal de ratos, expandidas in vitro e mantidas com características de CTMs ou diferenciadas em osteoblastos. As CTMs foram caracterizadas por imunofenotipagem por citometria de fluxo para os marcadores CD29, CD31, CD34, CD45 e CD90. A diferenciação osteoblástica foi confirmada pela avaliação da expressão gênica de runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), fosfatase alcalina (*Alp*) e osteopontina (*Opn*) por PCR em tempo real. Duas semanas após a criação dos defeitos ósseos, foram realizadas as injeções das células. Foi avaliado a viabilidade das células após sua passagem pela agulha 21G utilizada nas injeções. O enxertamento e o tempo de permanência das células nos defeitos ósseos foram avaliados por bioluminescência utilizando injeção de CTMs-MO, CTMs-TA, OBs-MO e OBs-TA expressando luciferase. Quatro semanas após as injeções, os animais foram mortos e o tecido ósseo formado foi avaliado por microtomografia computadorizada, análise histológica, análise por nanoindentação e PCR em tempo real. Os dados foram submetidos ao teste de aderência à curva normal para determinar o teste estatístico adequado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Foi observado que a terapia celular com CTMs-MO, CTMs-TA, OBs-MO ou OBs-TA foi efetiva em injetar células viáveis, que permaneceram no local do defeito ósseo e induziram maior formação óssea em comparação com defeitos que não receberam células. Não houve diferença no tecido ósseo induzido por CTMs-MO ou CTMs-TA ou naquele induzido por OBs-MO ou OBs-TA. Apesar de algumas diferenças marcantes nas assinaturas moleculares, CTMs-MO, CTMs-TA, OBs-MO e OBs-TA foram capazes de formar tecido ósseo com as mesmas propriedades mecânicas do tecido ósseo existente na calvária.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal, osteoblasto, medula óssea, tecido adiposo, regeneração óssea, terapia celular.

Abstract

ABSTRACT

FREITAS, GP. **Effect of Local Injections of Mesenchymal Stem Cells or Osteoblasts on Bone Regeneration.** Thesis (Doctor's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2018. 131p.

Bone is a tissue with great capacity for regeneration, but in some situations, the extent of injury prevents tissue repair. In this scenario, cell therapy has attracted the attention of several research groups. However, many experimental aspects need to be better investigated to make this therapy an effective treatment for the regeneration of defects in bone tissue. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow (BM-MSCs) and adipose tissue (AT-MSCs), as well as osteoblasts (OBs), differentiated from these MSCs (BM-OBs and AT-OBs) to regenerate bone tissue when injected directly into defects of 5mm diameter created in calvaria of rats. For this, MSCs were obtained from bone marrow of femur and inguinal adipose tissue of rats, expanded in vitro and maintained with characteristics of MSCs or differentiated in OBs. The MSCs were characterized by immunophenotyping for markers CD29, CD31, CD34, CD45 and CD90 by flow cytometry. Osteoblastic differentiation was confirmed by the evaluation of the gene expression of runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), alkaline phosphatase (*Alp*) and osteopontin (*Opn*) by real-time PCR. Two weeks after the creation of the bone defects, the injections of the cells were performed. The viability of the cells after their passage through the 21 gauge (21G) needle used in the injections was evaluated. The cell tracking in bone defects was evaluated by bioluminescence using an injection of BM-MSCs, AT-MSCs, BM-OBs and AT-OBs expressing luciferase. Four weeks after the injections, the animals were killed, and the bone tissue formed was evaluated by computerized microtomography, histological analysis, nanoindentation analysis and real-time PCR. Data were submitted to the normal curve test to determine the appropriate statistical test. The level of significance was 5% ($p \leq 0.05$). It was observed that cell therapy with BM-MSCs, AT-MSCs, BM-OBs or AT-OBs was effective in injecting viable cells, which remained at the site of the bone defect and induced greater bone formation compared to defects that did not receive cells. There was no difference in bone tissue induced by either BM-MSCs or AT-MSCs or in that induced by BM-OBs or AT-OBs. Although some marked differences in molecular signatures, BM-MSCs, AT-MSCs, BM-OBs and AT-OBs were able to form bone tissue with the same mechanical properties of existing bone tissue in calvaria.

Key words: Mesenchymal stem cell, osteoblast, bone marrow, adipose tissue, bone regeneration, cell therapy.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Imagem e quantificação do sinal de luciferina emitido pelas CTMs-MO-Luc e CTMs-TA-Luc injetadas em defeitos ósseos em calvária de ratos. A presença de ambas as CTMs foi evidenciada em uma área bem delimitada dos defeitos ósseos após as injeções (A-B). O pico do sinal de luciferina foi no dia 4 e o sinal diminuiu gradualmente até o dia 14 (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). O animal do lado esquerdo (A): rato injetado com solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle).....	65
Figura 2:	Imagens geradas pelo equipamento IVIS, no corte coronal (A), corte sagital (B), corte transaxial (C) e reconstrução em 3D (D) mostram a presença de CTMs-MO-Luc localizadas na área do defeito ósseo, 4 dias após a injeção local das células.....	66
Figura 3:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO (A), CTMs-TA (B) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle - C) em 4 semanas. Os dados D-I são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=12). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Barra: A-C = 1,25 mm.....	67
Figura 4:	Fotomicrografia dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO (A e D), CTMs-TA (B e E) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) (C e F) em 4 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com CTMs-MO (A e D) ou CTMs-TA (B e E) observou-se tecido ósseo, os defeitos Controle (C e F) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Vermelho de Alizarina e Azul de Stevenel. ol: osso lamelar; oi: osso imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A-C = 1,25 mm; D-F = 100 μ m.....	68
Figura 5:	Módulo de elasticidade (A) e dureza (B) dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).....	69
Figura 6:	Expressão gênica de <i>Runx2</i> (A), <i>Sp7</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bmp4</i> (D), <i>Oc</i> (E) e <i>Opn</i> (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).....	70

Figura 7:	Expressão gênica da razão <i>Rankl/Opg</i> (A) e <i>Trap</i> (B) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).....	71
Figura 8:	Expressão gênica de marcadores ósseos <i>Runx2</i> (A), <i>Alp</i> (B) e <i>Opn</i> (C) dos osteoblastos derivados de medula óssea (OBs-MO) e do tecido adiposo (OBs-TA), aos 10 dias de cultivo. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células do grupo OBs-MO. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante.....	84
Figura 9:	Imagem e quantificação do sinal de luciferina emitido pelos OBs-MO-Luc e OBs-TA-Luc injetados em defeitos ósseos em calvária de ratos. A presença de ambos os OBs foi evidenciada em uma área bem delimitada dos defeitos ósseos após as injeções (A-B). O pico do sinal de luciferina foi no dia 4 e o sinal diminuiu gradualmente até o dia 14 (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). O animal do lado esquerdo (A): rato injetado com PBS sem células (Controle).....	85
Figura 10:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO (A), OBs-TA (B) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle - C) em 4 semanas. Os dados D-I são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=12). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p \leq 0,05$). Barra: A-C = 1,25 mm.....	87
Figura 11:	Fotomicrografia dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO (A e D), OBs-TA (B e E) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) (C e F), em 4 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com OBs-MO (A e D) ou OBs-TA (B e E) observou-se tecido ósseo, os defeitos Controle (C e F) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Vermelho de Alizarina e Azul de Stevenel. ol: osso lamelar; oi: osso imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A-C = 1,25 mm; D-F = 100 μ m.....	88

Figura 12:	Módulo de elasticidade (A) e dureza (B) dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO, OBs-TA ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) comparado com Calvária em 4 semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).....	89
Figura 13:	Expressão gênica de <i>Runx2</i> (A), <i>Sp7</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bmp4</i> (D), <i>Oc</i> (E) e <i>Opn</i> (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).....	90
Figura 14:	Expressão gênica da razão <i>Rankl/Opg</i> (A) e <i>Trap</i> (B) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).....	91
Figura suplementar 1:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT (A-C) e parâmetros (D-E) da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de 5×10^4 , 5×10^5 ou 5×10^6 CTMs-MO/defeito em 4 semanas (n=12). A porcentagem de volume ósseo (D) e o número de trabéculas (E) mostraram correlação positiva com a quantidade de células injetadas. Barra: A-C = 1,25mm.....	125
Figura suplementar 2:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com uma injeção local de CTMs-MO (A), duas injeções locais de CTMs-MO (B) ou quatro injeções locais de CTMs-MO (C) em 4 semanas (n=12). Os parâmetros volume ósseo (D), porcentagem de volume ósseo (E), superfície óssea (F), módulo de elasticidade (G) e dureza (H) mostraram correlação negativa com o número de injeções. Barra: A-C = 1,25 mm.....	126

Figura 15:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.....	127
Figura 16:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-TA em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.....	128
Figura 17:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.....	129
Figura 18:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.....	130
Figura 19:	Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-TA em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.....	131

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Porcentagem de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) expressando marcadores de superfície.....	63
Tabela 2.	Porcentagem de células viáveis após plaqueamento de 5×10^6 células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs-MO) usando ponteiras plástica de pipetas ou agulha de 21G, avaliadas em 6, 24 e 48 horas após o plaqueamento.....	63
Tabela 3.	Porcentagem de osteoblastos diferenciados a partir de CTMs obtidas da medula óssea (OBs-MO) e do tecido adiposo (OBs-TA) expressando marcadores de superfície.....	84

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	41
OBJETIVO GERAL.....	49
CAPÍTULO 1	53
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CTMs-MO E CTMs-TA PARA REGENERAR DEFEITOS	
ÓSSEOS	55
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
EXPERIMENTOS IN VITRO	55
1.2.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO.....	55
1.2.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA.....	56
1.2.3 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo.....	56
1.2.4 Avaliação da viabilidade celular após a passagem das CTMs pela agulha utilizada para as injeções locais	57
1.2.5 Transfecção das CTMs-MO e CTMs-TA para expressão do gene luciferase	57
EXPERIMENTOS IN VIVO.....	57
1.2.6 Procedimento cirúrgico para a criação de defeito ósseo	57
1.2.7 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de CTMs-MO e CTMs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais	58
1.2.8 Tratamento dos defeitos ósseos	59
1.2.9 Análise microtomográfica (micro-CT)	59
1.2.10 Análise histológica.....	60
1.2.11 Análise por nanoindentação.....	60
1.2.12 Análise por PCR em tempo real.....	61
1.2.13 Análise estatística.....	62
1.3 RESULTADOS.....	62
1.3.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo.....	62
1.3.2 Avaliação da viabilidade celular após a passagem das CTMs-MO pela agulha utilizada para as injeções locais	63
1.3.3 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de CTMs-MO e CTMs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais	64
1.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por micro-C	66
1.3.5 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por análise histológica	68
1.3.6 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por ensaios de nanoindentação	68
1.3.7 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por PCR em tempo real	69
1.4 DISCUSSÃO	71

1.5 CONCLUSÕES	76
CAPÍTULO 2	77
 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OBs-MO E OBs-TA PARA REGENERAR DEFEITOS ÓSSEO	79
 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
 2.2 MATERIAL E MÉTODOS	79
 EXPERIMENTOS IN VITRO.....	79
2.2.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO e CTMs-TA.....	79
2.2.2 Diferenciação osteoblástica das CTMs-MO e CTMs-TA	79
2.2.3 Caracterização dos OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real.....	80
2.2.4 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II)	80
2.2.5 Transfecção dos OBs-MO e OBs-TA para expressão do gene luciferase	80
 EXPERIMENTOS IN VIVO	80
2.2.6 Procedimento cirúrgico para a criação de defeito ósseo	80
2.2.7 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de OBs-MO e OBs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais	80
2.2.8 Tratamento dos defeitos ósseos	81
2.2.9 Análise microtomográfica (micro-CT).....	81
2.2.10 Análise histológica	81
2.2.11 Análise por nanoindentação	82
2.2.12 Análise por PCR em tempo real	82
2.2.13 Análise estatística	82
 2.3 RESULTADOS	83
2.3.1 Caracterização dos OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real	83
2.3.2 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II)	84
2.3.3 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de OBs-MO e OBs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais	85
2.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de OBs-MO e OBs-TA por micro-CT	86
2.3.5 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de OBs-MO e OBs-TA por análise histológica	88
2.3.6 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de OBs-MO e OBs-TA por ensaios de nanoindentação.....	88
2.3.7 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real	89
 2.4 DISCUSSÃO	91
 2.5 CONCLUSÕES	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS.....	113
ANEXO A	115
ANEXO B.....	117

APÊNDICES..... 123

APÊNDICE A..... 125

APÊNDICE B..... 126

APÊNDICE C..... 127

APÊNDICE D..... 128

APÊNDICE E..... 129

APÊNDICE F..... 130

APÊNDICE G..... 131

Introdução

INTRODUÇÃO

Todos os anos milhões de pessoas sofrem com perdas de tecidos e/ou órgãos para as quais os tratamentos mais comumente empregados são o transplante de órgãos, a reconstrução cirúrgica ou a utilização de aparatos mecânicos (GOLDSTEIN et al., 2012; PEPPER, 2012; ZHENG et al., 2012; ORYAN et al., 2017). O tecido ósseo apresenta grande capacidade de regeneração quando lesado por traumas, processos infecciosos ou neoplasias. No entanto, em algumas situações a extensão do dano ultrapassa a capacidade de regeneração do tecido, como por exemplo, em 5-10% das fraturas traumáticas (BRYDONE et al., 2010; MEESTERS et al., 2018).

No intuito de melhorar e acelerar o processo de reparo ósseo, diversas opções estão disponíveis para a prática clínica (AMINI et al., 2012; WU et al., 2018). Após as lesões de tecidos ósseos serem removidas e o osso remanescente fixado, o defeito ósseo resultante pode ser reconstruído e preenchido com enxerto autógeno, alógeno ou biomateriais (AMINI et al., 2012; MOSHIRI et al., 2015a). Apesar de alta taxa de sucesso, o uso de enxertos autógenos está associado a problemas como maior morbidade e a necessidade de mais de uma área cirúrgica (YOUNGER et al., 1989; ZWINGENBERGER et al., 2012). Adicionalmente, apesar dos enxertos alógenos estarem disponíveis em maiores quantidades e serem osteocondutores, existem relatos na literatura de transmissão de doenças, infecções bacterianas e aumento de incidência de resposta imune devido às diferenças nas características do osso do doador e do paciente (DELLOYE et al., 2007). Por fim, um substituto ósseo deve possuir características ideais, incluindo osteocondução, osteoindução e osteogênese (ORYAN et al., 2017). Apesar de diversos biomateriais terem sido criados e caracterizados, nenhum até o momento pode ser completamente aceito como uma alternativa ideal comparado com enxertos autógenos, devido à baixa habilidade de osteoindução e osteogênese (BIGHAM-SADEGH et al., 2015).

Nesse cenário, estratégias de medicina regenerativa baseadas no uso de células têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa. Dentre elas, a terapia celular, como um dos métodos utilizados no intuito de aumentar o processo de reparo ósseo, surgiu como uma estratégia promissora (GIULIANI et al., 2013; GAUBYS et al., 2018).

O interesse da comunidade científica pelo uso de células na regeneração óssea, em grande parte, originou-se a partir dos estudos realizados pelo grupo liderado por Alexander Friedenstein, que primeiro identificou a presença de células-tronco na medula óssea, e pela comprovação de que essas são as células que participam do processo de reparo de fraturas ósseas (TAGUCHI et al., 2005; BIANCO et al., 2008). Dentre as várias denominações que essas células receberam, o termo células-tronco mesenquimais (CTMs) tornou-se o mais popular e amplamente utilizado (AUBIN, 2008).

As CTMs tem sido amplamente utilizadas em transplante de CTMs, engenharia tecidual, terapia gênica e imunoterapia (REISER et al., 2005; MARION et al., 2006; ZHAO et al., 2016; GAUBYS et al., 2018). Inicialmente, as CTMs foram isoladas a partir de medula óssea (CTMs-MO) (FRIEDENSTEIN et al., 1970), mas considerando o procedimento altamente invasivo para obtenção e a baixa incidência (1 em 10^5 células), outras fontes como sangue de cordão umbilical, tecido epitelial, tecido muscular, tecido adiposo (CTMs-TA) e polpa dentária têm sido investigadas (CICUTTINI et al., 1994; MAKHLUF et al., 2000; WU et al., 2010; WITKOWSKA-ZIMNY & WALENKO, 2011; ARWERT et al., 2012; ZHANG et al., 2014; MARRELLI et al. 2015a).

As CTMs podem ser obtidas de tecido adiposo por um processo menos invasivo e em maior quantidade quando comparado à medula óssea (KERN et al., 2006). Assim como as CTMs-MO, as CTMs-TA são capazes de diferenciação osteoblástica e adipocítica (KERN et al., 2006; PENG et al., 2008; REBELATTO et al., 2008; ABUNA et al., 2016). No entanto, estudos conduzidos por diferentes grupos de pesquisa mostram ou um maior potencial de diferenciação tanto osteoblástica quanto adipocítica de CTMs-TA humanas quando comparadas às CTMs-MO ou que as CTMs de ambas as origens exibem capacidades semelhantes de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica (KERN et al., 2006; REBELATTO et al., 2008). Em CTMs de ratos, foi observado que a diferenciação osteoblástica é favorecida em culturas derivadas de medula óssea e a diferenciação adipocítica é maior em culturas derivadas de tecido adiposo (PENG et al., 2008; ABUNA et al., 2016). As CTMs-MO apresentaram maiores expressões de RNA mensageiro e de proteína de marcadores osteoblásticos, assim como maior formação de matriz extracelular mineralizada, quando comparadas às CTMs-TA,

ambas crescidas em condições osteogênicas (ABUNA et al., 2016). Por outro lado, independentemente da capacidade distinta de diferenciação osteoblástica *in vitro*, CTMs-MO e CTMs-TA parecem estimular a osteogênese quando utilizadas *in vivo* (BELOTI et al., 2012; SEMYARI et al., 2016) e, portanto, as duas populações celulares são adequadas para investigações envolvendo o uso de células para o tratamento de defeitos ósseos. No entanto, os potenciais de formação óssea dessas CTMs ainda não foram comparados em experimentos *in vivo* utilizando-se as mesmas condições experimentais.

Do ponto de vista de antigenicidade, as CTMs são vantajosas, uma vez que não induzem tal resposta, assim como células diferenciadas a partir delas (LIU et al., 2006). As CTMs expressam níveis muito baixos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe 1 e não expressam MHC classe 2 (JACOBS et al., 2013; SALAMI et al., 2018). Além disso, elas são consideradas células imunoprivilegiadas que inibem tanto a atividade quanto a proliferação das células exterminadoras naturais e linfócitos B, suprimem a proliferação de linfócitos T e a maturação de células dendríticas (BRUNO et al., 2015; SALAMI et al., 2018). Adicionalmente, tem sido mostrado que a produção pelos macrófagos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6 e IL-12p70 é significativamente suprimida pelas CTMs, enquanto a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-12p40 são aumentadas (KOVACH et al., 2015). Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa já utilizou células alogênicas, como por exemplo CTMs e osteoblastos, para o reparo de tecido ósseo sem observar respostas antigênicas (BELOTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015; FREITAS et al., 2017; SOUZA et al., 2018).

De maneira geral, as células podem ser utilizadas associadas a biomateriais, que funcionam como carreadores na engenharia de tecidos, diretamente por injeção sistêmica ou local na terapia celular (ROSA et al., 2008; PAGNI et al., 2012; LIAO et al., 2014a; LIAO et al., 2014b). Nosso grupo de pesquisa tem avaliado biomateriais carreadores, interações entre células que afetam a osteogênese e estratégias de engenharia de tecido utilizando CTMs-MO e osteoblastos, sendo esses associados a carreadores naturais (esponja de gelatina), vítreos (Bio-sca) ou compósitos (PLGA/CaP) para o reparo de defeitos em calvárias de ratos (BELOTI et al., 2012; SICCHIERI et al., 2012; SANTOS et al., 2015; FERRAZ et al., 2017). Nossos resultados mostraram que as células, independentemente do seu estágio de

diferenciação, produzem maior formação óssea do que os biomateriais isolados sem, no entanto, produzir a completa regeneração dos defeitos. Ao menos em parte, isso se deve ao comportamento biológico desses carreadores que podem ser degradados muito rapidamente e de forma não previsível como a esponja de gelatina ou atraírem células multinucleadas como o PLGA/CaP (BELOTI et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Quanto às CTMs derivadas de tecido adiposo, pesquisadores injetaram CTMs-TA diretamente na região de necrose vascular de cabeça de fêmur de coelhos, e após dois meses da intervenção, a injeção de CTMs-TA aumentou a osteogênese e a microestrutura vascular reduzida pelo tecido necrótico (ABUDUSAIM et al., 2011). Outro efeito benéfico de CTMs-TA foi também reportado em um caso clínico, onde a combinação de CTMs-TA autógenas e biomaterial (cola de fibrina) foi utilizada para reconstrução de defeito de calota craniana de uma criança, sendo observada satisfatória formação de tecido ósseo 3 meses após o tratamento (LENDECKEL et al., 2004).

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para colocar células dentro de defeitos ósseos, podendo as células serem aplicadas através de injeções sistêmicas (intravascular) ou injeções locais (HORWITZ et al., 1999; HORWITZ et al., 2001; HERNIGOU et al., 2005a; HERNIGOU et al., 2005b; LE BLANC et al., 2005; ELSATTAR et al., 2014; ORYAN et al., 2017). Injeções intravasculares (intravenosa ou intra-arterial) de CTMs têm sido usadas em estudos clínicos, e alguns resultados promissores têm sido reportados (HORWITZ et al., 2001; LE BLANC et al., 2005), como demonstrado, por exemplo, em um dos primeiros trabalhos sobre o uso da terapia celular para aumentar a formação óssea, no qual os autores relatam terem realizado infusão intravenosa de aspirado de medula óssea para o tratamento de crianças com osteogênese imperfeita, obtendo resultado muito satisfatório (HORWITZ et al., 1999). Entretanto, apesar dos benefícios relatados pela injeção intravascular de CTMs para o reparo ósseo, alguns problemas têm sido relatados, como um significativo aprisionamento de células após a passagem pelos pulmões e formação de microtrombos (CASTELO-BRANCO et al., 2012).

O uso de injeções locais de CTMs na região de interesse tem sido sugerida (ORYAN et al., 2017). Alguns trabalhos mostram o tratamento de fraturas não consolidadas utilizando aspirado de medula óssea, com maior concentração de células mononucleares, injetado diretamente no sítio da fratura, sendo a técnica

bem-sucedida em 53 de uma amostra de 60 pacientes (HERNIGOU et al., 2005a; HERNIGOU et al., 2005b). Mais recentemente, um estudo também utilizando aspirado de medula óssea administrado pelo método de injeção local em casos de não-união de fraturas, mostrou que 80% dos casos apresentaram completo reparo após 3 meses do tratamento (ELSATTAR et al., 2014). Adicionalmente, foi mostrado em experimento pré-clínico, que uma injeção local de osteoblastos diferenciados a partir de CTMs-MO acelera o reparo em defeitos ósseos criados em raios de coelhos (KIM et al., 2007). Posteriormente, esses mesmos autores mostraram em experimento clínico, que uma injeção local de osteoblastos diferenciados a partir de CTMs-MO acelera o reparo de fraturas de ossos longos (KIM et al., 2009). Além desses achados, resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que a injeção direta de osteoblastos derivados de calvária de ratos recém-nascidos aumenta a formação óssea em defeitos de calvária de ratos (SOUZA et al., 2018).

O número ideal de células que deveria ser usado para tratamento de defeitos ósseos é debatido na literatura. Em um estudo clínico utilizando a via sistêmica para administração de CTMs objetivando o tratamento de defeitos ósseos em humanos, foram realizadas duas injeções de CTMs baseado no peso corporal do paciente, sendo a primeira injeção contendo 1×10^6 células/Kg e a segunda injeção contendo 5×10^6 células/Kg, com um intervalo de 8 a 21 dias entre as intervenções, obtendo resultados favoráveis ao uso da terapia (HORWITZ et al., 2002). Em outro estudo, também utilizando a administração sistêmica, os autores sugeriram o uso de infusão única de células, calculado como uma média de $6,64 \times 10^6$ células/Kg (ORYAN et al., 2017). Por outro lado, quando se utiliza injeções locais para tratamento de defeitos ósseos, deve-se considerar o tamanho dos defeitos a serem tratados, sendo sugerido injetar mais do que 1 milhão de CTMs por centímetro cúbico de tecido, para se obter um efetivo reparo ósseo (YOUNG et al., 2014). Nesse contexto, em experimentos pré-clínicos, uma revisão sistemática da literatura mostrou que o uso de injeções locais de células induzem a formação óssea mas não a regeneração dos defeitos e que dois fatores influenciam essa formação: a quantidade de células, com vantagens quando se utilizam quantidades igual ou maiores que 10^7 células; e a via de administração, sendo que a combinação das células com biomateriais apresentaria melhores resultados (LIAO et al., 2014b). No entanto, apenas quatro estudos avaliaram o uso de células aplicadas diretamente

nos defeitos ósseos e todos eles apresentam alguma limitação experimental (YAMADA et al., 2004; YAN et al., 2009; LIAO et al., 2011; AYKAN et al., 2013). Todos fizeram uso de uma injeção local de células nos defeitos ósseos, o que não seria suficiente para produzir o reparo ósseo, porque como demonstrado em uma revisão da literatura, após duas semanas somente 5% das células permanecem nos defeitos (WU et al., 2014). Os quatro estudos (YAMADA et al., 2004; YAN et al., 2009; LIAO et al., 2011; AYKAN et al., 2013) avaliaram somente a injeção de CTMs-MO, não explorando o potencial de células de diferentes origens ou diferenciadas em osteoblastos. A formação óssea foi avaliada por métodos menos precisos, que envolveram exames radiográficos, testes mecânicos e histomorfometria, e em somente um deles foi utilizada análise tomográfica, mas apenas para reconstruções tridimensionais (LIAO et al., 2014b). Por fim, em três desses estudos, as células foram utilizadas em defeitos imediatamente após a sua confecção, o que distancia esse tratamento da prática clínica.

Baseado nos achados acima, o objetivo desse estudo foi investigar a eficácia do uso da terapia celular com injeção local de células na regeneração de defeitos ósseos criados em calvária de ratos. Para mimetizar o tratamento de defeito ósseo pré-existente, as injeções de células somente foram realizadas 2 semanas após a criação dos defeitos. Utilizando esse modelo experimental, foram comparadas as CTMs-MO com as CTMs-TA e os osteoblastos diferenciados dessas CTMs, OBs-MO com OBs-TA. A formação óssea foi avaliada por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT), análise histológica, ensaio de nanoindentação e expressão gênica. Adicionalmente, foram avaliados a viabilidade das células após as injeções e o tempo de permanência delas nos defeitos ósseos.

Objetivo Geral

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de injeções locais de células para regenerar defeitos ósseos de calvária de ratos. Para tanto, foram comparadas as CTMs-MO com as CTMs-TA e, separadamente, os osteoblastos diferenciados a partir dessas CTMs, OBs-MO com os OBs-TA.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CTMs-MO E CTMs-TA PARA REGENERAR DEFEITOS ÓSSEOS

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as células obtidas da medula óssea e do tecido adiposo como CTMs.
- Avaliar a viabilidade celular após a passagem das CTMs pela agulha utilizada para as injeções locais.
- Avaliar o enxertamento e tempo de permanência de CTMs-MO e CTMs-TA nos defeitos ósseos após as injeções locais.
- Avaliar a formação de tecido ósseo após injeções locais de CTMs-MO e CTMs-TA.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP (Protocolo Nº 2015.1.191.58.9 e 2017.1.639.58.1, Anexo A).

EXPERIMENTOS IN VITRO

1.2.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO

Ratos machos Wistar pesando aproximadamente 150 g foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União, Brasil) e Xilazina (Calier, Brasil) por via intraperitoneal. Os fêmures foram retirados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea extraída por irrigação com meio de crescimento, que é o meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). As células da medula óssea foram cultivadas em meio de crescimento em frascos de 75

cm² (Corning Incorporated, EUA) até a subconfluência para permitir a seleção das CTMs-MO por aderência ao poliestireno. Após a subconfluência, as CTMs-MO foram tripsinizadas e subcultivadas por 10 dias em meio de crescimento para obter o número de células necessário para as injeções locais.

1.2.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA

As CTMs-TA foram obtidas de tecido adiposo da região inguinal dos mesmos ratos utilizados para obtenção de medula óssea. Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Invitrogen-Life Technologies, EUA), o tecido adiposo foi seccionado em fragmentos de aproximadamente 3 mm³ e submetido à digestão enzimática em 20 mL de solução de collagenase II 0,075% (Gibco-Life Technologies) a 37°C, sob agitação constante por 40 minutos. Em seguida, foi adicionado igual volume de meio de crescimento para neutralizar a ação enzimática. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos e o tecido adiposo flutuante removido. As células foram ressuspensas em meio de crescimento e as CTMs-TA foram cultivadas como descrito para as CTMs-MO.

Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

1.2.3 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo

Ao final de 10 dias, as culturas de CTMs-MO e CTMs-TA foram tripsinizadas (Gibco-Life Technologies) e a suspensão de células foi ajustada para a concentração de 5x10⁵ células por tubo e incubadas, separadamente, com os anticorpos primários anti-CD29, CD31, CD34, CD45 e CD90 (B&D Biosystems, EUA). As incubações foram realizadas por 30 minutos em ausência de luz. Em seguida, as células foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (Invitrogen-Life Technologies)/Tween-20 (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células submetidas a uma lavagem com solução de PBS (Invitrogen-Life Technologies). Após descarte do sobrenadante, foram adicionados às células 500 µL de solução de formaldeído (Merck, Alemanha) diluído a 1% em PBS (Invitrogen-Life Technologies), sendo este

estocado em refrigerador ao abrigo da luz até o momento de leitura no citômetro de fluxo FACSCanto™ (B&D Biosystems).

1.2.4 Avaliação da viabilidade celular após a passagem das CTMs pela agulha utilizada para as injeções locais

Para avaliar se a passagem de células através de agulha 21 gauge (21G) afeta a viabilidade celular, uma suspensão de CTMs-MO contendo 5×10^6 células em 50 μ L de veículo PBS (Invitrogen-Life Technologies) foi plaqueada em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de crescimento utilizando ponteiras plásticas de pipeta de 200 μ L ou agulha 21G (n=5). Após 6, 24 e 48 horas de cultura, azul de tripan (Sigma-Aldrich) foi adicionado a suspensão de células (1:1) e as células viáveis foram contadas usando o hemocitômetro de Neubauer.

1.2.5 Transfecção das CTMs-MO e CTMs-TA para expressão do gene luciferase

Com o objetivo de monitorar as células injetadas nos animais, previamente à injeção, CTMs-MO e CTMs-TA foram submetidas à transdução lentiviral com o vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro, o qual codifica o vetor luciferase e resistência à puromicina. As células expressando o gene luciferase (CTMs-MO-Luc e CTMs-TA-Luc) foram produzidas pela equipe do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, no Hemocentro de Ribeirão Preto. Para a transdução, os vírus foram adicionados às células a uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 3, na presença de 8 μ g/mL de polibreno. As células foram incubadas por 18 horas a 37°C, quando o meio de cultura foi substituído. Após 48 horas, as células foram submetidas a seleção por puromicina (1 μ g/mL) por 6 dias. As colônias resistentes foram cultivadas até serem injetadas nos animais.

EXPERIMENTOS IN VIVO

1.2.6 Procedimento cirúrgico para a criação de defeito ósseo

Ratos machos Wistar pesando aproximadamente 250g foram submetidos à cirurgia para preparação de defeitos ósseos de 5 mm nas calvárias. Para isso, os animais foram anestesiados com solução anestésica de Ketamina (Agener União) - anestésico geral - e Xilazina (Calier) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - na

proporção de 75 mg/kg de peso corporal de Ketamina e 6 mg/kg de peso corporal de Xilazina, injetada por via intraperitoneal. Foi também realizada analgesia pré-operatória com Flunixin meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Após tricotomia e anti-sepsia com solução de povidina-iodo alcoólica na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O periósteo dos ossos parietais foi descolado e o defeito, produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina (Neodent, Brasil) com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico. A pele foi então suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e os limites dos defeitos ósseos foram determinados por palpação e delimitados na pele com marcadores permanentes, a fim de possibilitar sua localização para, posteriormente, realizar-se as injeções de células. Em seguida, os animais foram medicados com Flunixin meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough) e dose única de uma solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Os ratos foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água “ad libitum” e sob observação constante.

1.2.7 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de CTMs-MO e CTMs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais

Para avaliação do enxertamento e tempo de permanência das células nos defeitos ósseos, 2 semanas após a criação dos defeitos, foi realizada injeção local de CTMs-MO-Luc ou CTMs-TA-Luc e os sinais de luminescência foram observados com auxílio do equipamento IVIS Spectrum (Perkin Elmer, EUA). Para isso, os animais foram anestesiados com isoflurano 2% (Cristal Pharma, Brasil) e as células, na quantidade de 5×10^6 células em 50 μ L de veículo PBS (Invitrogen-Life Technologies) foram injetadas subperiostealmente com a utilização de uma agulha 21G, inserida tangenciando a calota craniana de tal forma que a extremidade da agulha estivesse próxima ao centro do defeito e com o bisel voltado para posição ventral. Para a observação dos sinais de luminescência, os animais receberam o

substrato D-luciferina (PerkinElmer) por injeção subcutânea próxima a região dos defeitos ósseos, na dosagem de 150 mg/kg, 5 minutos antes da análise. Em seguida, os animais foram colocados na posição ventral dentro da caixa do aparelho e receberam continuamente o gás anestésico isoflurano 2%. Os sinais de luminescência foram identificados e quantificados em quintuplicata (n=5) pelo software Living Image® (Xenogen, EUA) até quando houve o desaparecimento total do sinal.

1.2.8 Tratamento dos defeitos ósseos

Duas semanas após a criação dos defeitos, os animais foram anestesiados, como descrito anteriormente no item 1.2.6, e os defeitos ósseos foram tratados com injeção local de 5×10^6 CTMs-MO ou CTMs-TA diluídas em 50 μ L de veículo PBS (Invitrogen-Life Technologies). Como controle, foram utilizados defeitos ósseos que receberam injeções locais de veículo PBS (Invitrogen-Life Technologies) sem células (Controle) (n=12). Foi também avaliado o efeito de injeções repetidas de CTMs-MO, sendo os períodos e a quantidade de repetições das injeções baseados no tempo de permanência das células no defeito ósseo, determinado no experimento anteriormente descrito no item 1.2.7. Decorridas 4 semanas da injeção de células, contadas a partir da primeira injeção nos animais que receberam injeções repetidas, os animais foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Calier) e as calvárias foram removidas com a utilização de discos diamantados (KG Sorensen, Brasil) para avaliação do tecido ósseo formado. Com o objetivo de comparar o osso formado com o tecido ósseo existente na calvária, algumas amostras de tecido ósseo retiradas de animais com a mesma idade dos grupos avaliados (Calvária) foram também processadas para as análises descritas abaixo.

1.2.9 Análise microtomográfica (micro-CT)

Todas as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponada (pH=7) por no mínimo 48 horas. A análise foi realizada no micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1 μ m. Os dados foram adquiridos por um software de aquisição de imagens 2D do próprio

equipamento e as reconstruções 3D, necessárias para a análise, foram feitas pelo software NRecon. Após as reconstruções, foram analisados na região dos defeitos ósseos produzidos os seguintes parâmetros: 1) volume de tecido ósseo; 2) porcentagem do volume de tecido ósseo em relação ao osso pré-existente no defeito ósseo; 3) superfície óssea; 4) espessura trabecular; 5) número de trabéculas e 6) separação trabecular. Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são aqueles preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (BOUXSEIN et al., 2010).

1.2.10 Análise histológica

Após as análises microtomográficas, as amostras foram preparadas para obtenção de cortes não-descalcificados. Para isso, as amostras foram mantidas em solução de paraformaldeído 4% tamponada (pH=7) por 48 horas e transferidas para uma solução de 70% etanol por 3 dias. Após a desidratação, as calvárias foram embebidas em resina (LR White Grade, Inglaterra) e seccionadas utilizando o sistema de corte Exakt (Exakt, Alemanha). Em seguida, as lâminas foram montadas e polidas. Parte das amostras foi corada com azul de Stevenel e vermelho de alizarina para análise histológica. Para a análise histológica, as lâminas foram observadas em um microscópio DMLB (Leica, EUA) e as imagens, adquiridas com uma câmera digital DC300F (Leica) acoplada ao microscópio.

1.2.11 Análise por nanoindentação

Para as análises de nanoindentação, foram utilizadas lâminas histológicas obtidas como descrito acima, mas sem coloração. Para isso, lâminas histológicas de cortes não-descalcificados, não coradas, foram polidas com suspensão de diamante, com partículas variando entre 1 e 9 μm (Buehler, EUA) e hidratadas por 24 horas. Essas análises foram realizadas no Department of Biomaterials and Biomimetics, New York University, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Guilherme Coelho. Nessas análises, o módulo de elasticidade e a dureza do osso formado foram avaliados no nanoindentador (Hysitron TI 950, EUA) após detectar por imagem o tecido ósseo em microscópio de luz (Hysitron, EUA). Vinte e cinco indentações foram realizadas por lâmina, usando 3 lâminas por grupo ($n=3$). O perfil de carga foi desenvolvido com um pico de 300 μN , a uma taxa de 60 $\mu\text{N}/\text{segundo}$,

seguido por um tempo de carga de 10 segundos e um tempo de descarga de 2 segundos. O período de carga prolongado permite ao osso um relaxamento para uma maior resposta linear, de forma que qualquer efeito de fluência do tecido ocorra na porção de descarga. Para cada curva, o módulo de elasticidade e a dureza do tecido ósseo foram medidos pelo software Hysitron TriboScan, onde o módulo de elasticidade E , foi calculado pela fórmula:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i}$$

Onde E_r é o módulo de elasticidade reduzido (GPa), ν (0,3) é o Coeficiente de Poisson para o osso cortical, E_i (1140 GPa) e ν_i (0,07) são o módulo de elasticidade e o coeficiente de Poisson para o indentador, respectivamente (HOFFLER et al., 2000; HOFFLER et al., 2005).

1.2.12 Análise por PCR em tempo real

Para a análise da expressão de genes relacionados à remodelação óssea, o tecido ósseo formado nos defeitos foi removido com o uso de uma trefina de 6 mm de diâmetro (Neodent) sob irrigação abundante com soro fisiológico, como descrito por LOPES et al., 2014. Calvárias, obtidas como descrito anteriormente no item 1.2.8, foram utilizadas como controle. Após a remoção, as amostras foram lavadas com PBS (Invitrogen-Life Technologies), acondicionadas em tubo de 1,5 mL (Eppendorf, Alemanha) com 1 mL de Trizol (Invitrogen-Life Technologies) e mantidas a -20°C . A amostra de RNA total foi obtida de fragmentos ósseos coletados e triturados de seis animais para cada um dos tratamentos dos defeitos ósseos e controle avaliados. Foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1 μL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA). A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 μg de RNA total. Esse procedimento foi realizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems (Invitrogen-Life Technologies). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o sistema

de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 μ L contendo 5 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 μ L das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/ μ L de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células do grupo Calvária. Foi avaliada a expressão gênica de genes relacionados a formação óssea, como *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Oc*, *Bmp4*, *Opn* e genes relacionados a reabsorção óssea, como a razão *Rankl/Opg* e *Trap*.

1.2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para as análises de correlação, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (n=12). O tempo de permanência das células nos defeitos ósseos (n=5), os dados da análise microtomográfica (n=12 para cada parâmetro), os dados da análise por nanoindentação (n=3 para cada parâmetro) e os dados da análise por PCR em tempo real (n=3) foram comparados por ANOVA One-way, seguido pelo teste de Tukey quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo

Aos 10 dias de cultura, o perfil de expressão dos marcadores de superfície confirma que as culturas de CTMs-MO e CTMs-TA apresentam características de CTMs. Ambas apresentaram alta porcentagem de células expressando os marcadores de superfície CD29 e CD90. Além disso, apresentaram uma baixa

expressão dos marcadores de superfície CD31, CD34 e CD45, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) expressando marcadores de superfície

Marcador de Superfície	CTMs-MO (%)	CTMs-TA (%)
CD29	99,5	99,5
CD90	98,9	99,8
CD31	6,7	2,5
CD34	1,9	0,1
CD45	22,6	2,0

1.3.2 Avaliação da viabilidade celular após a passagem das CTMs-MO pela agulha utilizada para as injeções locais

A viabilidade celular não é afetada quando as CTMs-MO são injetadas pela agulha 21G quando comparada àquelas que passam pelas ponteiras plásticas de pipetas, que é o padrão para cultura de células. Como pode ser observado na Tabela 2, a porcentagem de células viáveis após o plaqueamento com agulhas 21G e ponteiras plásticas de pipetas não é estatisticamente significativa em nenhum dos tempos de cultura (6h, $p = 0,274$; 24h, $p = 0,974$; e 48h, $p = 0,659$).

Tabela 2. Porcentagem de células viáveis após plaqueamento de 5×10^6 células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs-MO) usando ponteiras plástica de pipetas ou agulha de 21G, avaliadas em 6, 24 e 48 horas após o plaqueamento

Período (horas)	Ponteiras plásticas (% células viáveis)	Agulha 21G (% células viáveis)	Valor de p
6	100	86,95	0,274
24	100	99,1	0,974
48	100	90,9	0,659

1.3.3 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de CTMs-MO e CTMs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais

As imagens de bioluminescência mostram a presença de CTMs-MO-Luc e CTMs-TA-Luc em uma área bem definida dos defeitos ósseos (Figura 1A-B). A quantificação dos sinais de bioluminescência não mostrou diferenças do sinal de luciferina entre os grupos CTMs-MO-Luc e CTMs-TA-Luc independente do período avaliado ($p = 0,240$). Ambos os grupos celulares mostraram um mesmo padrão do sinal de luciferina, sendo o pico do sinal no dia 4 e progressivamente reduzido até o dia 14. Adicionalmente, foi observado que no período de 7 dias após injeção local das células, o sinal de luciferina diminuiu drasticamente (aproximadamente 70%) em ambos os grupos celulares (Figura 1C).

Sinal de Luciferina

Figura 1. Imagem e quantificação do sinal de luciferina emitido pelas CTMs-MO-Luc e CTMs-TA-Luc injetadas em defeitos ósseos em calvária de ratos. A presença de ambas as CTMs foi evidenciada em uma área bem delimitada dos defeitos ósseos após as injeções (A-B). O pico do sinal de luciferina foi no dia 4 e o sinal diminuiu gradualmente até o dia 14 (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). O animal do lado esquerdo (A): rato injetado com solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle).

As reconstruções 3D geradas pelo equipamento IVIS mostram que as CTMs-MO estavam localizadas na área injetada, 4 dias após a injeção local das células (Figura 2A-D).

Figura 2. Imagens geradas pelo equipamento IVIS, no corte coronal (A), corte sagital (B), corte transaxial (C) e reconstrução em 3D (D) mostram a presença de CTMs-MO-Luc localizadas na área do defeito ósseo, 4 dias após a injeção local das células.

1.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por micro-CT

As reconstruções 3D geradas por micro-CT mostram que 4 semanas após injeção local, defeitos tratados com CTMs-MO ou CTMs-TA exibiram maior formação óssea comparados com Controle (Figura 3A-C). Os parâmetros gerados pela análise de micro-CT indicaram que o volume ósseo (Figura 3D, $p = 0,001$) e a porcentagem de volume ósseo (Figura 3E, $p = 0,001$) foram maiores em defeitos de calvária tratados com CTMs-MO ou CTMs-TA comparados com Controle. A superfície óssea (Figura 3F, $p = 0,001$) e o número de trabéculas (Figura 3H, $p = 0,001$) foram maiores em defeitos de calvária tratados com CTMs-MO comparados com CTMs-TA ou Controle. A separação trabecular (Figura 3I, $p = 0,001$) foi menor em defeitos de calvária tratados com CTMs-MO ou CTMs-TA comparados com Controle, enquanto a espessura trabecular (Figura 3G, $p = 0,303$) não foi afetada por qualquer tratamento. Adicionalmente, são apresentadas todas as reconstruções 3D geradas por micro-CT dos defeitos tratados com injeção local de CTMs-MO (Apêndice C, Figura 15), CTMs-TA (Apêndice D, Figura 16) e Controle (Apêndice E, Figura 17).

Figura 3: Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO (A), CTMs-TA (B) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle - C) em 4 semanas. Os dados D-I são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=12). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Barra: A-C = 1,25 mm.

1.3.5 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por análise histológica

Em geral, os cortes histológicos não-descalcificados mostraram uma significativa formação óssea em defeitos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA, enquanto para o grupo que recebeu PBS (Controle) os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo (Figura 4A-F). Confirmando os resultados por micro-CT, os defeitos de calvária tratados com injeção local de CTMs-MO (Figura 4A) ou injeção local de CTMs-TA (Figura 4B) exibiram aproximadamente a mesma quantidade de tecido ósseo. Vale a pena notar as áreas de tecido ósseo lamelar e tecido ósseo imaturo em defeitos de calvária tratados com injeção local de CTMs-MO (Figura 4D) ou injeção local de CTMs-TA (Figura 4E).

Figura 4: Fotomicrografia dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO (A e D), CTMs-TA (B e E) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) (C e F) em 4 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com CTMs-MO (A e D) ou CTMs-TA (B e E) observou-se tecido ósseo, os defeitos Controle (C e F) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Vermelho de Alizarina e Azul de Stevenel. ol: osso lamelar; oi: osso imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A–C = 1,25 mm; D–F = 100 μ m.

1.3.6 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por ensaios de nanoindentação

Os parâmetros quantitativos gerados pelos ensaios de nanoindentação indicaram que não houve diferença no módulo de elasticidade (Figura 5A, $p = 0,450$) ou dureza (Figura 5B, $p = 0,100$) nos defeitos tratados com injeção local de CTMs-MO ou injeção local CTMs-TA comparados com Calvária.

Figura 5: Módulo de elasticidade (A) e dureza (B) dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

1.3.7 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de CTMs-MO e CTMs-TA por PCR em tempo real

Como esperado, todos os tecidos ósseos analisados expressaram genes relacionados à formação e reabsorção óssea, mas com diferenças entre os tratamentos. A expressão gênica (Figura 6A-F) de *Runx2*, *Sp7*, *Alp* e *Bmp4* do osso formado mostraram o mesmo padrão, sendo CTMs-MO > CTMs-TA = Calvária ($p = 0,001$ para todos os genes). Para *Oc* a expressão gênica foi CTMs-MO > Calvária > CTMs-TA ($p = 0,001$). Para *Opn*, a expressão gênica foi CTMs-MO = Calvária > CTMs-TA ($p = 0,003$).

Figura 6: Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C), *Bmp4* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A razão da expressão gênica *Rankl/Opn* (Figura 7A) foi CTMs-TA > Calvária > CTMs-MO ($p = 0,001$) e a expressão gênica de *Trap* (Figura 7B) foi Calvária > CTMs-TA > CTMs-MO ($p = 0,001$).

Figura 7: Expressão gênica da razão *Rankl/Opg* (A) e *Trap* (B) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO ou CTMs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

1.4 DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos a eficácia da terapia celular baseada no uso de injeções locais de CTMs-MO ou CTMs-TA para induzir a formação de tecido ósseo em defeitos criados em calvárias de ratos. Para isso, primeiramente, as CTMs-MO e CTMs-TA foram selecionadas pela aderência ao plástico das garrafas de cultura e caracterizadas pela expressão de um painel de marcadores de superfície. Adicionalmente, observamos que as células mantiveram sua viabilidade após serem injetadas através de agulhas 21G, que as células permaneceram dentro dos defeitos ósseos por até 12 dias e avaliamos o efeito de injeções repetidas de células.

Em 2006, DOMINICI e colaboradores por demanda da International Society for Cell Therapy, estabeleceram critérios para caracterizar CTMs derivadas de humanos. Os critérios foram: 1) aderência ao plástico em condições normais de cultura celular, 2) alta expressão de marcadores de superfície, como por exemplo CD105, CD73 e CD90 combinado com baixa expressão de CD34, CD45 e CD14, e 3) capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Nesse contexto, a caracterização por meio da expressão de marcadores de superfície é rápida, barata e altamente específica, tornando-se um padrão para a caracterização e comparação de populações de CTMs (HARTING et al., 2008). Entretanto, muitos estudos discutem a importância da seleção celular por citometria

de fluxo (“cell sorting”) com o objetivo de se obter uma população pura de CTMs (PROCKOP 1997; JIANG et al., 2002; ALHADLAQ et al., 2004; GANG et al., 2007; SCHREPFER et al., 2007). Esses autores acreditam que sem a aplicação dessa técnica, células-tronco hematopoiéticas e macrófagos estarão presentes na cultura de CTMs. No entanto, tem sido observado esse particular problema quando as CTMs são isoladas de camundongo (HARTING et al., 2008). Em 2008, HARTING e colaboradores afirmaram que a seleção celular por citometria de fluxo não é necessária para se obter uma população homogênea (> 95%) de CTMs derivadas de ratos, sugerindo o uso de um meio de cultura específico, chamado de MAPC (do inglês “multipotent adult progenitor cell media”) durante os experimentos para a obtenção de uma população rica em CTMs. Entretanto, no presente estudo, utilizamos meio de cultura padrão para CTMs de ratos (MEM 10%) e obtivemos resultados semelhantes aos preconizados por DOMINICI et al., 2006 e encontrados por HARTING et al., 2008. Adicionalmente, após a obtenção das células, CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas por 10 dias para permitir sua seleção por aderência ao plástico de garrafas de cultura. Essas células foram caracterizadas como CTMs por meio da expressão de marcadores de superfície, sendo que ambas as populações celulares expressaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem de células expressando marcadores de células hematopoiéticas, como CD31, CD34 e CD45. Esses resultados são corroborados por estudo prévios que mostraram similar expressão destes marcadores de superfície em CTMs de ratos machos Wistar (BARZILAY et al., 2009; FREITAS et al., 2017). A alta porcentagem de CTMs-MO expressando CD45 comparada com as CTMs-TA pode ser atribuída a origem hematopoiética dessas células (FREITAS et al., 2017).

O sucesso da terapia celular depende de vários fatores incluindo a viabilidade das células após a injeção, permanência dessas células no local desejado e o número de células utilizadas. Existem evidências que uma alta porcentagem de células viáveis é alcançada quando a injeção é feita pela combinação do uso de agulhas curtas com alto calibre e taxa de injeção de aproximadamente 150 μ L/min (AMER et al., 2015). Baseado nisso, antes das células serem injetadas nos animais, realizamos um experimento para avaliar a viabilidade celular após a passagem das células pela agulha 21G, que foi utilizada para injetar as células nos defeitos ósseos, comparando com ponteiros plásticos de pipetas

(utilizadas rotineiramente durante cultura celular) e de acordo com a taxa de ejeção de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os resultados obtidos comprovam que o método de injeção utilizado permitiu a manutenção da viabilidade celular, portanto, mostrando-se adequado aos propósitos desse estudo.

Não existe consenso na literatura em relação ao número ideal de células a serem injetadas para que a terapia celular seja eficaz, entretanto existe uma ideia geral que uma maior e melhor formação óssea é alcançada quando injeta-se alta concentração de células (LIAO et al., 2014b). Baseado nisso, realizamos um experimento para avaliar o efeito do número de células na formação óssea e observamos que quanto maior o número de células injetadas, maior a formação óssea obtida (Apêndice A, Figura suplementar 1). Esse conceito é corroborado por achados de uma correlação direta entre melhores resultados em casos de não-união de fraturas com alto número de células injetadas (HERNIGOU et al., 2005b). Considerando o tamanho das CTMs-MO aderidas ao plástico de cultura celular (DOCHEVA et al., 2008), a maior concentração de células que nós injetamos foi 5×10^6 células/defeito, que é o número máximo de células que caberiam dentro de um defeito ósseo com volume aproximado de 10 mm^3 . Baseado nesses achados, podemos sugerir que a concentração ideal de células para otimizar a formação óssea seria de aproximadamente 500.000 células/ mm^3 de defeito.

No ensaio para avaliação do enxertamento e tempo de permanência das células nos defeitos ósseos, utilizando injeção de CTMs-MO-Luc ou CTMs-TA-Luc, foi observado a localização e permanência dessas células nos defeitos ósseos, e apesar do sinal de luciferina diminuir drasticamente do dia 4 para o dia 7, essas células foram detectadas nos defeitos ósseos até o dia 12, resultado similar ao que foi encontrado em um estudo anterior (FREITAS et al., 2017). Ao menos em parte, essas células permaneceram nos defeitos ósseos devido a estratégia de injetar células somente 2 semanas após a criação dos defeitos. Além de mimetizar um defeito pré-existente, essa estratégia permite injetar células em um defeito que o ambiente local exercerá baixa influência comparado com defeitos recém-criados, no qual apresentam alta concentração de células inflamatórias e citocinas (LACEY et al., 2009; LOI et al., 2016).

Nesse estudo, foi utilizado como modelo, ratos machos Wistar sexualmente maduros (ADAMS et al., 1983) para criação de defeitos no osso parietal. A opção

pelo defeito unilateral e não bilateral teve como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral (GOMES & FERNANDES, 2011). Após isso, nós esperamos duas semanas para tratar esses defeitos ósseos, com o objetivo de simular um defeito pré-existente, uma vez que, nesse modelo animal, 15 dias são equivalente a 1 ano em seres humanos (SENGUPTA, 2013).

Em relação a formação óssea, as imagens 3D reconstruídas, os parâmetros avaliados pelo micro-CT e análise histológica confirmaram nossa hipótese de que CTMs-MO e CTMs-TA, quando diretamente injetadas em defeitos ósseos de calvária de ratos, são capazes de induzir maior formação óssea quando comparadas com somente o veículo (PBS – Controle). Evidências indicam que o efeito terapêutico induzido por CTMs é devido a habilidade dessas células modificarem o microambiente do hospedeiro (efeito parácrino) ao invés de se diferenciarem ou serem incorporadas ao tecido do hospedeiro (GRANERO-MOLTO et al., 2009; LINERO et al., 2014), resultando em uma limitada resposta inflamatória, no qual facilita a osteogênese e a angiogênese, contribuindo para o reparo ósseo (SHAO et al., 2015). Baseado em alguns parâmetros, como a superfície óssea e o número de trabéculas, pode-se observar uma leve vantagem em termos de formação óssea com o uso de CTMs-MO comparado com CTMs-TA, mas esse achado não permite excluir as CTMs-TA como uma fonte viável de células para terapia celular.

Objetivando comparar o tecido ósseo formado induzido pelas injeções de células com o osso já existente na calvária, ensaios de nanoindentação e de expressão gênica dos marcadores de remodelação óssea foram realizados. O módulo de elasticidade e dureza do osso formado pelas injeções locais de CTMs-MO e CTMs-TA foram muito próximos dos valores obtidos do osso da calvária. Considerando que as propriedades mecânicas do osso são fortemente correlacionadas com a mineralização e formação de matriz orgânica do osso (BOIVIN et al., 2008), o uso de injeções locais de CTMs-MO e CTMs-TA induziu a formação de tecido ósseo similar ao existente antes da criação dos defeitos. Por outro lado, a avaliação da expressão de genes envolvidos na remodelação óssea mostrou diferenças importantes no perfil de expressão gênica no tecido ósseo formado. Os seis genes avaliados envolvidos na formação óssea (*Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bmp4*, *Oc* e *Opn*) foram regulados positivamente no tecido ósseo formado por

injeção local de CTMs-MO comparado ao osso formado por injeção local de CTMs-TA. Adicionalmente, os genes avaliados envolvidos na reabsorção óssea (razão *Rankl/Opg* e *Trap*) foram regulados positivamente no osso formado por injeção local de CTMs-TA. Tais diferenças na expressão de genes envolvidos na formação e reabsorção óssea pode ser interpretada como diferentes estágios de remodelação óssea (SVERZUT et al., 2012; LOPES et al., 2014; SCALIZE et al., 2016). Considerando a expressão gênica do osso da calvária como representação do equilíbrio da remodelação óssea, o tecido ósseo formado por injeção local de CTMs-TA parece apresentar maior proximidade com o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Por outro lado, no tecido ósseo formado por injeção local de CTMs-MO, a formação óssea parece ser o processo predominante.

Apesar de uma formação óssea significativa, a completa regeneração dos defeitos com injeção local de células não foi alcançada, como evidenciado em reconstruções 3D e análise histológica. Em seguida, baseado nos resultados do tempo de permanência das células nos defeitos ósseos, avaliamos se a estratégia de utilizar injeções locais repetidas (semanais) de CTMs-MO poderia resultar na completa regeneração dos defeitos. No entanto, encontramos uma correlação negativa entre a formação óssea e o número de injeções (Apêndice B, Figura suplementar 2). Isso pode ter ocorrido porque as injeções repetidas de CTMs-MO, pelo menos com a frequência usada aqui, perturbam o processo de formação óssea, causando talvez uma resposta citotóxica leve (ISAKOVA et al., 2014; KOL et al., 2015).

Analisando todos esses achados, nesse estudo nós mostramos que a terapia celular baseada em injeções locais de CTMs-MO ou CTMs-TA é efetiva em colocar células viáveis no local do defeito ósseo e induzir uma significativa formação óssea. Apesar de algumas diferenças marcantes nas assinaturas moleculares, as CTMs-MO e CTMs-TA foram capazes de formar a mesma quantidade de tecido ósseo e com as mesmas propriedades mecânicas do tecido ósseo existente na calvária. No entanto, apesar destes resultados, a regeneração completa dos defeitos ósseos continua a ser um desafio que merece investigações adicionais, podendo basear-se no uso de células já comprometidas com o genótipo e fenótipo osteoblástico.

1.5 CONCLUSÕES

- O método empregado para obtenção e isolamento das CTMs-MO e CTMs-TA resultou em uma população rica em CTMs.
- O método utilizado para injetar as células nos defeitos ósseos não afeta a viabilidade celular.
- As CTMs-MO e CTMs-TA permaneceram nos defeitos ósseos por até 12 dias após as injeções locais.
- Injeções locais de CTMs-MO e CTMs-TA resultaram em maior formação óssea comparados aos defeitos controles, não apresentando diferenças entre as diferentes fontes de células. Adicionalmente, injeções locais repetidas de CTMs-MO não aumentam a formação do tecido ósseo.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE OBs-MO E OBs-TA PARA REGENERAR DEFEITOS ÓSSEOS

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os osteoblastos diferenciados a partir de CTMs obtidas da medula óssea e do tecido adiposo.
- Avaliar o enxertamento e tempo de permanência de OBs-MO e OBs-TA nos defeitos ósseos após as injeções locais.
- Avaliar a formação de tecido ósseo após injeções locais de OBs-MO e OBs-TA.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTOS IN VITRO

2.2.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO e CTMs-TA

Para os experimentos descritos a seguir, as CTMs-MO e CTMs-TA foram obtidas e cultivadas como descritos anteriormente nos itens 1.2.1 e 1.2.2.

2.2.2 Diferenciação osteoblástica das CTMs-MO e CTMs-TA

Após a subconfluência, as culturas de CTMs-MO e CTMs-TA foram tripsinizadas e subcultivadas por 10 dias em meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica (OBs-MO e OBs-TA). O meio osteogênico foi composto por meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), β-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

2.2.3 Caracterização dos OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real

Ao final de 10 dias de cultura, a quantificação da expressão gênica dos marcadores ósseos *Runx2*, *Alp* e *Opn* foi realizada nos OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real, como descrito anteriormente no item 1.2.12. Os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células do grupo OBs-MO.

2.2.4 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II)

Ao final de 10 dias de cultura, os OBs-MO e OBs-TA foram analisados para avaliação da expressão das moléculas de histocompatibilidade envolvidas na resposta imune adquirida (MHC, do inglês major histocompatibility complex) Classes I e II por citometria de fluxo no aparelho FACSCanto™ (B&D Biosciences), como descrito anteriormente no item 1.2.3.

2.2.5 Transfecção dos OBs-MO e OBs-TA para expressão do gene luciferase

Com o objetivo de monitorar as células injetadas nos animais, previamente à injeção, OBs-MO e OBs-TA foram submetidos à transdução lentiviral com o vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro, o qual codifica o vetor luciferase e resistência à puromicina. As células expressando o gene luciferase (OBs-MO-Luc e OBs-TA-Luc) foram produzidas pela equipe do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, no Hemocentro de Ribeirão Preto, como descrito anteriormente no item 1.2.5.

EXPERIMENTOS IN VIVO

2.2.6 Procedimento cirúrgico para a criação de defeito ósseo

Ratos machos Wistar pesando aproximadamente 250g foram submetidos à cirurgia para preparação de defeitos ósseos de 5 mm nas calvárias. O procedimento cirúrgico para criação de defeitos ósseos nas calotas dos ratos foi realizado conforme descrito anteriormente no item 1.2.6.

2.2.7 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de OBs-MO e OBs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais

Para avaliação do enxertamento e tempo de permanência das células nos defeitos ósseos, 2 semanas após a criação dos defeitos, foi realizada injeção local de OBs-MO-Luc ou OBs-TA-Luc e os sinais de luminescência foram observados com auxílio do equipamento IVIS Spectrum (Perkin Elmer), como descrito anteriormente no item 1.2.7. Os sinais de luminescência foram identificados e quantificados em quintuplicata (n=5) pelo software Living Image® (Xenogen) até quando houve o desaparecimento total do sinal.

2.2.8 Tratamento dos defeitos ósseos

Após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente no item 1.2.6 e os defeitos ósseos foram tratados com injeção local de 5×10^6 OBs-MO ou OBs-TA diluídos em 50 μ L de veículo PBS (Invitrogen). Como controle, foram utilizados defeitos ósseos que receberam injeção local de veículo PBS (Invitrogen) sem células (Controle) (n=12). Decorridas 4 semanas da injeção de células, os animais foram mortos com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Calier) e as calvárias foram removidas com a utilização de discos diamantados (KG Sorensen) para avaliação do tecido ósseo formado. Com o objetivo de comparar o osso formado com o tecido ósseo existente na calvária, algumas amostras de tecido ósseo retiradas de animais com a mesma idade dos grupos avaliados (Calvária) foram também processadas para as análises descritas abaixo.

2.2.9 Análise microtomográfica (micro-CT)

As análises microtomográficas foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 1.2.9, no micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan). Após as reconstruções, os mesmos parâmetros descritos no item 1.2.9 foram avaliados.

2.2.10 Análise histológica

Após as análises microtomográficas, as amostras foram preparadas para obtenção de cortes não-descalcificados, como descrito anteriormente no item 1.2.10. Para a análise histológica, as lâminas foram observadas em um microscópio DMLB (Leica) e as imagens, adquiridas com uma câmera digital DC300F (Leica) acoplada ao microscópio.

2.2.11 Análise por nanoindentação

Para as análises de nanoindentação, foram utilizadas lâminas histológicas obtidas como descrito no item 2.2.10, mas sem coloração. Para isso, lâminas histológicas de cortes não-descalcificados, não coradas, foram polidas com suspensão de diamante, com partículas variando entre 1 e 9 μm (Buehler) e hidratadas por 24 horas. Essas análises foram realizadas no Department of Biomaterials and Biomimetics, New York University, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Guilherme Coelho. Nessas análises, o módulo de elasticidade e a dureza do osso formado foram avaliados no nanoindentador (Hysitron TI 950), após detectar por imagem o tecido ósseo em microscópio de luz (Hysitron), como descrito anteriormente no item 1.2.11. Vinte e cinco indentações foram realizadas por lâmina, usando 3 lâminas por grupo (n=3).

2.2.12 Análise por PCR em tempo real

Para a análise da expressão de genes relacionados à remodelação óssea, o tecido ósseo formado nos defeitos foi removido com o uso de uma trefina de 6 mm de diâmetro (Neodent) sob irrigação abundante com soro fisiológico, como descrito por LOPES et al., 2014. Calvárias, obtidas como descrito anteriormente no item 1.2.8, foram utilizadas como controle. A extração, quantificação do RNA total, confecção da fita de cDNA e as reações de PCR em tempo real foram feitas conforme descrito no anteriormente no item 1.2.12, utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies). As reações foram realizadas em triplicata (n=3). Os resultados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células do grupo Calvária. Foi avaliada a expressão gênica de genes relacionados a formação óssea, como *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Oc*, *Bmp4*, *Opn* e genes relacionados a reabsorção óssea, como a razão *Rankl/Opg* e *Trap*.

2.2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise da diferenciação osteoblástica por PCR em tempo real (n=3) foi comparada pelo teste t de Student. O tempo de permanência das células nos defeitos ósseos (n=5), os dados da análise microtomográfica (n=12 para cada parâmetro), os dados da análise por nanoindentação (n=3 para cada parâmetro) e os dados da análise por PCR em tempo real (n=3) foram comparados por ANOVA One-way, seguido pelo teste de Tukey quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterização dos OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real

Aos 10 dias de cultura, a análise por PCR em tempo real confirmou que as CTMs-MO e CTMs-TA se diferenciaram em osteoblastos, uma vez que os marcadores ósseos *Runx2*, *Alp* e *Opn* foram expressos em ambas as células (Figura 8A-C). A expressão gênica de *Runx2* foi similar nos OBs-MO comparados com OBs-TA (Figura 8A, $p = 0,373$). A expressão gênica de *Alp* foi maior nos OBs-MO comparados com OBs-TA (Figura 8B, $p < 0,001$). A expressão gênica de *Opn* foi similar nos OBs-MO comparados com OBs-TA (Figura 8C, $p = 0,460$).

Figura 8. Expressão gênica de marcadores ósseos *Runx2* (A), *Alp* (B) e *Opn* (C) dos osteoblastos derivados de medula óssea (OBs-MO) e do tecido adiposo (OBs-TA), aos 10 dias de cultivo. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células do grupo OBs-MO. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante.

2.3.2 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II)

Aos 10 dias de cultura, ambas as culturas de OBs-MO e OBs-TA apresentam baixa porcentagem de células expressando MHC classe I e II, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de osteoblastos diferenciados a partir de CTMs obtidas da medula óssea (OBs-MO) e do tecido adiposo (OBs-TA) expressando marcadores de superfície

Marcador de Superfície	OBs-MO (%)	OBs-TA (%)
MHC Classe I	2,8	1,2
MHC Classe II	0,5	0,6

2.3.3 Avaliação do enxertamento e tempo de permanência de OBs-MO e OBs-TA nos defeitos ósseos após injeções locais

As imagens de bioluminescência mostram a presença de OBs-MO-Luc e OBs-TA-Luc em uma área bem definida dos defeitos ósseos (Figura 9A-B). A quantificação dos sinais de bioluminescência não mostrou diferenças do sinal de luciferina entre os grupos OBs-MO-Luc e OBs-TA-Luc independente do período avaliado ($p = 0,130$). Ambos os grupos celulares mostraram um mesmo padrão do sinal de luciferina, sendo o pico do sinal no dia 4 e progressivamente reduzido até o dia 14. Adicionalmente, foi observado que no período de 7 dias após injeção local das células, o sinal de luciferina diminuiu drasticamente (aproximadamente 70%) em ambos os grupos celulares (Figura 9C).

Figura 9. Imagem e quantificação do sinal de luciferina emitido pelos OBs-MO-Luc e OBs-TA-Luc injetados em defeitos ósseos em calvária de ratos. A presença de ambos os OBs foi evidenciada em uma área bem delimitada dos defeitos ósseos após as injeções (A-B). O pico do sinal de luciferina foi no dia 4 e o sinal diminuiu gradualmente até o dia 14 (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). O animal do lado esquerdo (A): rato injetado com PBS sem células (Controle).

2.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de OBs-MO e OBs-TA por micro-CT

As reconstruções 3D geradas por micro-CT mostram que 4 semanas após injeção local, defeitos tratados com OBs-MO e OBs-TA exibiram maior formação óssea comparados com Controle (Figura 10A-C). Os parâmetros gerados pela análise de micro-CT indicaram que o volume ósseo (Figura 10D, $p < 0,001$), porcentagem de volume ósseo (Figura 10E, $p < 0,001$), superfície óssea (Figura 10F, $p < 0,001$) e número de trabéculas (Figura 10H, $p < 0,001$) foram maiores em defeitos de calvária tratados com OBs-MO ou OBs-TA comparados com Controle. Além disso, a espessura trabecular (Figura 10G, $p = 0,002$) foi menor em defeitos de calvária tratados com OBs-TA comparados com Controle, enquanto não foi estatisticamente diferente comparados com OBs-MO. Adicionalmente, são apresentadas todas as reconstruções 3D geradas por micro-CT dos defeitos tratados com injeção local de OBs-MO (Apêndice F, Figura 18), OBs-TA (Apêndice G, Figura 19) e Controle (Apêndice E, Figura 17).

Figura 10. Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO (A), OBs-TA (B) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle - C) em 4 semanas. Os dados D-I são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=12$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Barra: A-C = 1,25 mm.

2.3.5 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de OBs-MO e OBs-TA por análise histológica

Em geral, os cortes histológicos não-descalcificados mostraram uma significativa formação óssea em defeitos de calvária tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA, enquanto para o grupo que recebeu PBS (Controle) os defeitos estavam essencialmente preenchidos por tecido conjuntivo (Figura 11A-F). Confirmando os resultados por micro-CT, os defeitos de calvária tratados com injeção local de OBs-MO (Figura 11A) ou injeção local OBs-TA (Figura 11B) exibiram aproximadamente a mesma quantidade de tecido ósseo. Vale a pena notar as áreas de tecido ósseo lamelar e tecido ósseo imaturo em defeitos de calvária tratados com injeção local de OBs-MO (Figura 11D) ou injeção local de OBs-TA (Figura 11E).

Figura 11. Fotomicrografia dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO (A e D), OBs-TA (B e E) ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) (C e F), em 4 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com OBs-MO (A e D) ou OBs-TA (B e E) observou-se tecido ósseo, os defeitos Controle (C e F) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Vermelho de Alizarina e Azul de Stevenel. ol: osso lamelar; oi: osso imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A–C = 1,25 mm; D–F = 100 μ m.

2.3.6 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de OBs-MO e OBs-TA por ensaios de nanoindentação

Os parâmetros quantitativos gerados pelos ensaios de nanoindentação indicaram que o módulo de elasticidade foi maior em defeitos de calvária tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA comparados com Controle (Figura 12A, $p < 0,05$), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com Calvária (Figura 12A, $p > 0,05$). A dureza foi maior em defeitos de calvária tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA comparados com Controle (Figura 12B, $p < 0,05$), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com Calvária (Figura 12B, $p > 0,05$).

Figura 12. Módulo de elasticidade (A) e dureza (B) dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO, OBs-TA ou solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) comparado com Calvária em 4 semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

2.3.7 Avaliação do tecido ósseo formado após injeções de OBs-MO e OBs-TA por PCR em tempo real

Como esperado, todos os tecidos ósseos analisados expressaram genes relacionados à formação e reabsorção óssea. A expressão gênica (Figura 13A-F) de *Runx2* foi OBs-MO = OBs-TA > Calvária ($p = 0,004$), *Sp7* foi OBs-MO > OBs-TA > Calvária ($p < 0,001$), *Alp* foi OBs-TA > OBs-MO > Calvária ($p < 0,001$), *Bmp4* foi OBs-TA > OBs-MO > Calvária ($p < 0,001$), *Oc* foi OBs-MO > OBs-TA > Calvária ($p < 0,001$) e *Opn* foi OBs-TA = OBs-MO = Calvária ($p = 0,003$).

Figura 13. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C), *Bmp4* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

A razão da expressão gênica *Rankl/Opg* (Figura 14A) foi OBs-MO > OBs-TA = Calvária ($p < 0,001$) e a expressão gênica de *Trap* (Figura 14B) foi OBs-MO < OBs-TA = Calvária ($p = 0,003$).

Figura 14. Expressão gênica da razão *Rankl/Opg* (A) e *Trap* (B) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA em 4 semanas comparado com Calvária. A expressão gênica foi normalizada pela β -actina e as reais diferenças foram relativas a expressão gênica das células da Calvária. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos a eficácia da terapia celular baseada no uso de injeções locais de OBs-MO ou OBs-TA para induzir a formação de tecido ósseo em defeitos criados em calvárias de ratos. Para isso, primeiramente os OBs-MO e OBs-TA foram obtidos pela diferenciação osteoblástica de CTMs-MO e CTMs-TA, respectivamente. Essa diferenciação foi confirmada por meio da expressão de genes marcadores ósseos por PCR em tempo real. Adicionalmente, observamos que os OBs-MO e os OBs-TA não induziriam resposta imune por expressarem baixos níveis de MHC classes I e II e que ambas as células permaneceram nos defeitos ósseos por até 12 dias.

Nos experimentos de cultura de células, diferenciamos CTMs derivadas de medula óssea e de tecido adiposo em OBs. Para tal, cultivamos as CTMs-MO e CTMs-TA em meio osteogênico, que é o meio de crescimento acrescentado de indutores como, a dexametasona, o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato, por um período de 10 dias, e avaliamos a diferenciação por PCR em tempo real. Este conjunto de indutores ativa uma série de processos para induzir a mineralização in vitro (LANGENBACH & HANDSCHEL, 2013). A dexametasona induz a expressão de *Runx2* mediada pela via Wnt/ β -catenina (HONG et al., 2009). O ácido ascórbico induz o aumento da secreção de colágeno tipo I para a formação da matriz extracelular, enquanto o β -glicerofosfato serve como uma fonte de fosfato para a

mineralização (LANGENBACH & HANDSCHEL, 2013). Nossos resultados mostraram que independente da fonte celular, ambas as CTMs tiveram capacidade semelhante de diferenciação osteoblástica, pois apresentaram expressão gênica para todos os marcadores ósseos avaliados, sem que houvesse diferenças entre eles, com exceção da expressão de *Alp* que foi maior nos OBs-MO. Esses resultados são corroborados por estudos prévios, os quais demonstraram que CTMs-MO e CTMs-TA apresentam capacidade semelhante de diferenciação em células osteoblásticas (KERN et al., 2006; REBELATTO et al., 2008).

Um dos desafios para a utilização de células alógenas em terapia celular, consiste na possibilidade de rejeição dessas células pelo sistema imunológico do hospedeiro. Para tanto, moléculas de MHC Classes I e II são encarregadas de apresentar peptídeos antigênicos para células T CD8+ e T CD4+, respectivamente (MOKHTARI & LACHMAN, 2016). Os resultados da avaliação dos complexos principais de histocompatibilidade I e II por citometria de fluxo mostraram uma baixa porcentagem de OBs-MO e OBs-TA expressando essas moléculas, permitindo que fossem utilizadas com riscos mínimos de resposta imune nos ratos em que foram injetadas. Este resultado é corroborado por estudos anteriores que relataram baixos níveis de MHC Classe I e ausência de MHC Classe II em cultura de osteoblastos (KHOURY & ARNAUD, 1993; REYES-BOTELLA et al., 2002). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa já utilizou osteoblastos alógenos para o reparo de tecido ósseo, sem observar respostas antigênicas (FREITAS et al., 2017; Souza et al., 2018).

Como mencionado no capítulo 1, um dos fatores que influencia o sucesso da terapia celular é a viabilidade das células injetadas. Nesse contexto, não realizamos tal avaliação para os osteoblastos pois, recentemente, mostramos que essas células apresentam viabilidade similar àquela das CTMs após serem injetadas através da agulha 21G (SOUZA et al., 2018).

O ensaio para avaliação do enxertamento e tempo de permanência dos OBs-MO e OBs-TA expressando luciferase, mostrou que ambos os OBs permaneceram nos defeitos ósseos por até 12 dias. Esses achados são similares aos observados quando injetamos CTMs-MO ou CTMs-TA, mostrado no capítulo 1. Ao menos em parte, esses resultados são devidos ao fato dessas células serem injetadas somente 2 semanas após a criação dos defeitos, devendo esse ambiente

ser menos hostil às células comparado com aquele de defeitos recém-criados, que devem apresentar maior concentração de células inflamatórias e citocinas (LACEY et al., 2009; LOI et al., 2016).

A respeito da formação óssea obtida nos defeitos, os resultados baseados nas reconstruções 3D das análises de micro-CT mostraram maior formação óssea nos defeitos tratados com injeção local de OBs-MO ou OBs-TA comparado ao Controle. Corroborando as reconstruções 3D, quase todos os parâmetros gerados pelo micro-CT indicaram ter havido maior formação óssea nos defeitos tratados com células. Esses resultados estão também em concordância com a análise histológica, que mostrou similaridades no tecido ósseo formado nos grupos que receberam injeção local de OBs-MO ou OBs-TA, enquanto que no grupo Controle foi observada predominância de tecido conjuntivo. Esses achados são corroborados por outro estudo do nosso grupo de pesquisa, que utilizando também dos princípios de terapia celular, através de injeção local de osteoblastos derivados de calvária de ratos recém-nascidos, observou em defeitos de calota de ratos, maior formação óssea nos grupos que receberam as injeções locais de osteoblastos comparados a grupos que não receberam células (SOUZA et al., 2018). Entretanto, com relação à formação óssea, os resultados do presente estudo são diferentes daqueles encontrados por FREITAS et al., 2017, no qual os autores utilizaram os mesmos tipos de osteoblastos e injetados da mesma maneira, mas associados a um biomaterial (membrana de poli(vinilideno-trifluoretileno) / titanato de bário). Naquele estudo foi observada maior formação óssea no grupo que recebeu a associação biomaterial/OBs-MO. Tal discrepância é de difícil explicação porque o biomaterial é considerado biocompatível frente a diversos tipos celulares (TEIXEIRA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; LOPES et al., 2014), no entanto, não foi ainda avaliado seu efeito sobre células derivadas do tecido adiposo, com as quais talvez não se mostre completamente biocompatível.

Ensaio de nanoindentação têm sido utilizados para mensurar as propriedades mecânicas do tecido ósseo e para avaliar a qualidade óssea (BOIVIN et al., 2008; COELHO et al., 2014). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que os tecidos ósseos induzidos pela injeção local de OBs-MO ou OBs-TA apresentaram valores de módulo de elasticidade e dureza iguais aos do osso da Calvária. Esses achados indicam que além de obtermos uma maior formação óssea

quando injetamos células osteoblásticas, obtemos a formação de um tecido ósseo de qualidade similar ao tecido ósseo existente na calvária, independente da fonte celular utilizada.

Com o objetivo de investigar alguns dos aspectos moleculares do osso formado através de injeção local de OBs-MO ou OBs-TA, nós avaliamos a expressão gênica de alguns marcadores da remodelação óssea. Entre os genes relacionados a formação óssea, a expressão gênica de *Runx2*, um dos principais fatores de transcrição envolvida na formação óssea (KOMORI et al., 2010) e a expressão gênica de *Opn*, uma das proteínas não-colágenas envolvida na formação dos cristais de apatita da matriz (SODEK et al., 2000), apresentaram expressões similares entre os grupos OBs-MO e OBs-TA. A expressão gênica de *Alp*, uma importante enzima envolvida no processo de mineralização no qual disponibiliza fosfato para a produção da matriz (MILLAN et al., 2013) e a expressão gênica de *Bmp4*, uma importante proteína envolvida na indução da formação óssea e de cartilagens (NISHIMURA et al., 2012), apresentaram expressão maior no grupo OBs-TA comparado com OBs-MO. A expressão gênica de *Sp7*, um fator de transcrição envolvido na maturação dos osteoblastos (NAKASHIMA et al., 2002) e a expressão gênica de *Oc*, uma proteína não colágena produzida por osteoblastos antes da mineralização (OWEN et al., 1990), apresentaram maiores expressões no grupo OBs-MO comparado com OBs-TA. Entre os genes avaliados relacionados ao processo de reabsorção óssea, como a razão *Rankl/Opg* e *Trap* (LIU et al., 2015; LOPES et al., 2016), a expressão gênica da razão *Rankl/Opg* apresentou maior expressão no grupo OBs-MO comparado com OBs-TA. Entretanto, a expressão gênica de *Trap*, apresentou maior expressão no grupo OBs-TA comparado com OBs-MO. Analisando todos esses achados juntos, nossos resultados sugerem que o tecido ósseo formado por injeção local de OBs-MO ou OBs-TA apresenta um perfil molecular similar.

Nesse estudo, nós demonstramos que a terapia celular baseada em injeções locais de OBs-MO ou OBs-TA é efetiva em colocar células viáveis no local do defeito ósseo e induzir uma significativa formação óssea, apresentando uma formação de tecido ósseo com propriedades mecânicas e moleculares similares, independente das fontes celulares utilizadas.

2.5 CONCLUSÕES

- O método empregado para obtenção de osteoblastos resultou em uma população rica de OBs-MO e OBs-TA.
- Os OBs-MO e OBs-TA permaneceram dentro dos defeitos ósseos por até 12 dias.
- Injeções locais de OBs-MO e OBs-TA resultaram em maior formação óssea comparados aos defeitos controles, não apresentando diferenças entre as diferentes fontes de células.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, avaliamos o potencial de CTMs derivadas de medula óssea e de tecido adiposo, bem como de OBs diferenciados a partir dessas, para regenerar o tecido ósseo quando injetadas diretamente em defeitos de 5mm de diâmetro criados em calvárias de ratos. Observamos que a terapia celular foi efetiva em injetar células viáveis, que todos os tipos celulares avaliados permaneceram no local do defeito ósseo e induziram maior formação óssea comparados com defeitos que não receberam células. Adicionalmente, todas as células foram capazes de formar tecido ósseo com as mesmas propriedades mecânicas do tecido ósseo existente na calvária. No entanto, independente do grupo celular avaliado, não obtivemos regeneração completa desses defeitos. Portanto, esse modelo de estudo continua a ser um desafio que merece investigações adicionais. Como desdobramento desse trabalho, uma estratégia futura poderia ser baseada na utilização dessas células tratadas com fatores sabidamente relevantes para o processo de angiogênese, como por exemplo, o VEGF-A (do inglês vascular endothelial growth factor A), da osteogênese, como por exemplo, a BMP-9 (do inglês bone morphogenetic protein 9) ou a combinação de ambos, além do uso de modificação genética para sobre-expressar esses fatores, no intuito de se obter a completa regeneração do tecido ósseo.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abudusaimi A, Aihemaitijiang Y, Wang YH, Cui L, Maimaitiming S, Abulikemu M. Adipose-derived stem cells enhance bone regeneration in vascular necrosis of the femoral head in the rabbit. *J Int Med Res*. 2011;39:1852-60.
- Abuna RP, de Oliveira FS, Santos TS, Guerra TR, Rosa AL, Beloti MM. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2016;231:204-14.
- Adams N, Boice R. A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. *J Comp Psychol*. 1983;97:24–33.
- Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2004;13:436-48.
- Amer MH, White LJ, Shakesheff KM. The effect of injection using narrow-bore needles on mammalian cells: administration and formulation considerations for cell therapies. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67:640-50.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40:363–408.
- Arwert EN, Hoste E, Watt FM. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:170-80.
- Aubin JE. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: *Principles of bone biology*, John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz and T. John Martin. 2008;1:85-107.
- Aykan A, Ozturk S, Sahin I, Gurses S, Ural AU, Oren NC, Isik S. Biomechanical analysis of the effect of mesenchymal stem cells on mandibular distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg*. 2013;24:169-75.
- Barzilay R, Sadan O, Melamed E, Offen D. Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains. *Cytotherapy*. 2009;11:435-42.
- Beloti MM, Sicchieri LG, de Oliveira PT, Rosa AL. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:999-1005.
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2:313-319.
- Bigham-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Int Wound J*. 2015;12:238-247.

Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, Delmas PD. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*. 2008;43:532-8.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1468-86.

Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015;168:154-158.

Brydone AS, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224:1329-43.

Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, Buongusto F, Martinusso CA, do Rosario Jr A, Souza SA, Gutfilen B, Fonseca LM, Elia C, Madi K, Schanaider A, Rossi MI, Souza HS. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One*. 2012;7:e33360.

Cicuttini FM, Welch K, Boyd AW. Characterization of CD34+HLA-DR-CD38+ and CD34+HLA-DR-CD38- progenitor cells from human umbilical cord blood. *Growth Factors*. 1994;10:127-134.

Coelho PG, Takayama T, Yoo D, Jimbo R, Karunagaran S, Tovar N, Janal MN, Yamano S. Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: a bone histological, gene expression, and nanomechanical study. *Bone*. 2014;65:25-32.

Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: what they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg*. 2007;89:574-580.

Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med*. 2008;12:537-52.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.

Elsattar T, Alseedy A, Khalil A. Bone marrow injection in treatment of long bone nonunion. *Menoufia Med*. 2014;27:632-635.

Ferraz EP, Freitas GP, Crovace M, Peitl O, Zanotto E, de oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (bios-2p) for bone tissue engineering. *Biomedical materials*. 2017;12:045018.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Abuna RPF, Gimenes R, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow

and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. *Calcif Tissue Int.* 2017;101:312-20.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3:393-403.

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. Ssea-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007;109:1743-51.

Gaubys A, Papeckys V, Pranskunas M. Use of Autologous Stem Cells for the Regeneration of Periodontal Defects in Animal Studies: a Systematic Review and MetaAnalysis *J Oral Maxillofac Res.* 2018;9:e3.

Giuliani N, Lisignoli G, Magnani M, Racano C, Bolzoni M, Dalla Palma B, Spolzino A, Manferdini C, Abati C, Toscani D, Facchini A, Aversa F. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells Int.* 2013;312501.

Goldstein MJ, Lubezky N, Yushkov Y, Bae C, Guarrera JV. Innovations in organ donation. *Mt Sinai J Med.* 2012;79:351-364.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011;45:14-24.

Granero-Molto F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009;27:1887–1898.

Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2008;10:243-253.

Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005b;87:1430-7.

Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2005a;87:896-902.

Hoffler CE, Guo XE, Zysset PK, Goldstein SA. An application of nanoindentation technique to measure bone tissue lamellae properties. *J Biomech Eng.* 2005;127:1046-53.

Hoffler CE, Moore KE, Kozloff K, Zysset PK, Brown MB, Goldstein SA. Heterogeneity of bone lamellar-level elastic moduli. *Bone.* 2000;26:603-9.

Hong D, Chen HX, Xue Y, Li DM, Wan XC, Ge R, Li JC. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116:86-92.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8932-8937.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999;5: 309-313.

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001;97:1227-31.

Isakova IA, Lanclos C, Bruhn J, Kuroda MJ, Baker KC, Krishnappa V, Phinney DG. Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *PLoS One*. 2014;9:e87238.

Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol*. 2013;91:32-39.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418:41-9.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-301.

Khoury EL, Arnaud CD. Alkaline phosphatase-positive human osteoblasts do not normally express MHC class II antigens in vivo. *Bone* 1993;14:289–295.

Kim SJ, Jang JD, Lee SK. Treatment of long tubular bone defect of rabbit using autologous cultured osteoblasts mixed with fibrin. *Cytotechnology*. 2007;54:115-20.

Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im, SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HC, Lee SY. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009;10:20.

Kol A, Wood JA, Carrade Holt DD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, Walker NJ, Clark KC, Watson JL, Borjesson DL. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory

response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther.* 2015;15:73.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell tissue Res.* 2010;339:189-195.

Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *J Immunol Res.* 2015;2015:752510.

Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:735-42.

Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4:117.

Le Blanc K, Gotterstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Norden-Lindeberg S, Jansson M, Dalton A, Astrom E, Westgren M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation.* 2005;79:1607-1614.

Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;2:370-73.

Liao HT, Chen CT, Chen CH, Chen JP, Tsai JC. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *J Trauma.* 2011;70:228-37.

Liao HT, Chen YY, Lai YT, Hsieh MF, Jiang CP. The osteogenesis of bone marrow stem cells on mPEG-PCL-mPEG/hydroxyapatite composite scaffold via solid freeform fabrication. *Biomed Res Int.* 2014a;2014:321549.

Liao Y, Zhang XL, Li L, Shen FM, Zhong MK. Stem cell therapy for bone repair: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies with large animal models. *Br J Clin Pharmacol.* 2014b;78:718-726.

Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One.* 2014;8:e107001.

Liu H, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol.* 2006;176:2864-2871.

Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep.* 2015;11:3212-3218.

Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86:119-30.

Lopes HB, Ferraz EP, Almeida AL, Florio P, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Participation of MicroRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Biomater Sci Polym*. 2016;27:1369-1379.

Lopes HB, Santos TS, de Oliveira FS, Freitas GP, de Almeida AL, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation. *J Biomater Appl*. 2014;29:104-12.

Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268:669-672.

Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol*. 2006;420:339-361.

Marrelli M, Falisi G, Apicella A, Apicella D, Amantea M, Cielo A, Bonanome L, Palmieri F, Santacroce L, Giannini S, Di Fabrizio E, Rastelli C, Gargari M, Cuda G, Paduano F, Tatullo M. Behaviour of dental pulp stem cells on different types of innovative mesoporous and nanoporous silicon scaffolds with different functionalizations of the surfaces. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015a;29:991-997.

Meesters DM, Wijnands KAP, Brink PRG, Poeze M. Malnutrition and Fracture Healing: Are Specific Deficiencies in Amino Acids Important in Nonunion Development? *Nutrients*. 2018;31:10(11).pii: E1597.

Millan JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2013;93:299-306.

Mokhtari R, Lachman HM. The Major Histocompatibility Complex (MHC) in Schizophrenia: A Review. *J Clin Cell Immunol*. 2016;7:479.

Moshiri A, Oryan A, Meimandi-Parizi A. Synthesis, development, characterization and effectiveness of bovine pure platelet gel-collagen-polydioxanone bioactive graft on tendon healing. *J Cell Mol Med*. 2015a;19:1308-1332.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002;108:17-29.

Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem*. 2012;151:247-254.

Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*. 2017;204:59-83.

- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990;43:420–430.
- Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile WV. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:1310-9.
- Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17:761-773.
- Pepper JR. Update on mechanical circulatory support in heart failure. *Heart.* 2012;98:663-669.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science.* 1997;276:71-4.
- Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med.* 2008;233:901-913.
- Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5:1571-1584.
- Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2002;12:359-364.
- Rosa AL, de Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices.* 2008;5:719-28.
- Salami F, Tavassoli A, Mehrzad J, Parham A. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils. *Immunobiology.* 2018;6:30077-30079.
- Santos TS, Abuna RPF, Lopes HB, Gonçalves ALG, Beloti MM, Rosa AL. Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. *Regen Med.* 2015;10:127-133.
- Scalize PH, Bombonato-Prado KF, de Sousa LG, Rosa AL, Beloti MM, Semprini M, Gimenes R, de Almeida AL, de Oliveira FS, Hallak Regalo SC, Siessere S. Poly(Vinylidene Fluoride-Trifluorethylene)/barium titanate membrane promotes de novo bone formation and may modulate gene expression in osteoporotic rat model. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27:180.

Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg R, Reichenspurner H, Robbins RC, Pelletier MP. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16:105-107.

Semyari H, Rajipour M, Sabetkish S, Sabetkish N, Abbas FM, Kajbafzadeh AM. Evaluating the bone regeneration in calvarial defect using osteoblasts differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells on three different scaffolds: an animal study. *Cell Tissue Bank.* 2016;17:69-83.

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4:624-630.

Shao J, Zhang W, Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biol Res.* 2015;3:48-62.

Sicchieri LG, Crippa GE, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6:155-162.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:279-303.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. *Cytotherapy.* 2018;S1465-3249(18)30552-8.

Sverzut AT, Crippa GE, Morra M, Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analys. *Biomed Mater.* 2012;7:035007.

Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:31-6.

Teixeira LN, Crippa GE, Gimenes R, Zaghete MA, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:151–158.

Teixeira LN, Crippa GE, Trabuco AC, Gimenes R, Zaghete MA, Palioto DB, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. In vitro biocompatibility of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. *Acta Biomater.* 2010;6:979–989.

Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16:236-257.

Wu C, Pan W, Feng C, Su Z, Duan Z, Zheng Q, Hua C, Li C. Grafting materials for alveolar cleft reconstruction: a systematic review and best-evidence synthesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47:345-356.

- Wu T, Liu Y, Wang B, Li G. The roles of mesenchymal stem cells in tissue repair and disease modification. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9:424-431.
- Wu X, Wang S, Chen B, An X. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Tissue Res*. 2010;340:549-67.
- Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*. 2004;10:955-64.
- Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res*. 2009;27:442-6.
- Young HE, Hyer L, Black AC, Robinson JS. Adult stem cells: from bench-top to bedside. *World Scientific*. 2014;1-59.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989;3:192-5.
- Zhang WB, Zhong WJ, Wang L. A signal-amplification circuit between mir-218 and wnt/ β -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation. *Bone*. 2014;58:59-66.
- Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother*. 2016;2:3-20.
- Zheng GS, Su YX, Liao GQ, Chen ZF, Wang L, Jiao PF, Liu HC, Zhong YQ, Zhang TH, Liang YJ. Mandible reconstruction assisted by preoperative virtual surgical simulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113:604-611.
- Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD, Yao Z, Stiehler M, Goodman SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs*. 2012;26:245-56.

Anexos

ANEXO A

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2015.1.191.58.9 sobre a pesquisa intitulada “Efeito de injeções locais de células-tronco mesenquimais ou osteoblastos na regeneração do tecido ósseo”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 15/04/2015 (totalizando 140 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2015.1.191.58.9 regarding the research entitled “Effect of local injections of mesenchymal stem cells and osteoblasts on bone regeneration”, under the responsibility of Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 15/04/2015 (totalizing 140 animals).

Ribeirão Preto, 15 de abril de 2015.

Profa. Dra. Andara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

1

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que a proposta intitulada “Análise por PCR em Tempo Real do Osso Neoformado por Injeções Locais de Células-Tronco Mesenquimais ou Osteoblastos”, registrada com o nº 2017.1.639.58.1, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 22/11/2017.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	22/11/2017 a 22/06/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogêneo / Hannover
Nº de animais	40
Peso/Idade	150-200g / 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2017.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

ANEXO B

Produção científica obtida durante a realização do doutorado:

1. Artigos publicados em periódicos

Malta-Barbosa J, Navarro DR, Hirata R, **Freitas GP**, Bonfante EA, Coelho PG. Fatigue failure of external hexagon connections on cemented implant-supported crowns. *Implant Dentistry*, v. 27, p. 165-170, 2018.

Abuna RPF, de Oliveira FS, Reis JIR, Lopes HB, **Freitas GP**, Souza ATP, Beloti MM, Rosa AL. Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in rat osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, p. 749-756, 2018.

Souza ATP, Bezerra B, de Oliveira FS, **Freitas GP**, Trevisan RB, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, p. 8441-8449, 2018.

Souza ATP, **Freitas GP**, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. *Cytotherapy*, v. 20, p. 1267-1277, 2018.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Abuna RPF, Gimenes R, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. *Calcified Tissue International*, v. 101, p. 312-320, 2017.

Ferraz EP, **Freitas GP**, Crovace M, Peitl O, Zanotto E, de oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (bios-2p) for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, v. 12, p. 045018, 2017.

Freitas GP, Hirata R, Bonfante E, Tovar N, Coelho PG. Survival probability of narrow and standard-diameter implants with different implant-abutment connection designs. *International Journal of Prosthodontics*, v. 29, p. 179-185, 2016.

Patel A, Gil LF, Castellano A, **Freitas GP**, Navarro D, Peredo A, Tovar N, Coelho PG. Effect of simplified one-step drilling protocol on osseointegration. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, v. 36, p. 82-87, 2016.

Ferraz EP, Sverzut AT, **Freitas GP**, Sá JC, Alves C, Beloti MM, Rosa AL. Bone tissue response to plasma-nitrided titanium implant surfaces. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, p. 9-13, 2015.

Freitas GP, Lopes HB, Martins-Neto EC, Almeida ALG, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of nanotopography created by H₂SO₄/H₂O₂ on bone response to titanium implant. *Journal of Oral Implantology*, v. 42, p. 240-247, 2015.

Yoo D, Marin C, **Freitas GP**, Tovar N, Bonfante E, Teixeira HS, Janal MN, Coelho PG. Surface characterization and in vivo evaluation of dual acid-etched and grit-blasted/acid-etched implants in sheep. *Implant Dentistry*, v. 24, p. 256-262, 2015.

Hirata R, Bonfante E, Anchieta RB, Machado LS, **Freitas GP**, Fardin VP, Tovar N, Coelho PG. Reliability and failure modes of narrow implant systems. *Clinical Oral Investigations*, v. 20, p. 1505-1513, 2015.

Freitas GP, Tova N, Granato R, Marin C, Coelho PG. Nanosynt: avaliação histológica e histomorfométrica de um novo substituto ósseo. O uso da nanotecnologia na conquista de um melhor padrão de osteocondução. *Implant News*, v. 11, p. 296-301, 2014.

Lopes HB, Santos TS, de Oliveira FS, **Freitas GP**, Almeida ALG, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 29, p. 104-112, 2014.

2. Artigo submetido relacionado ao projeto de doutorado

Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Cell Therapy: Effect of locally injected mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvaria defects. Artigo submetido para o periódico *Journal of Bone and Mineral Research*.

3. Artigos submetidos relacionados a projetos paralelos (co-autoria)

Lopes HB, **Freitas GP**, Elias CN, Tye CE, Stein JL, Stein G, Lian JB, Rosa AL, Beloti MM. Participation of Integrin- β 3 in Osteoblast Differentiation Induced by Titanium with Nano or Microtopography. Artigo submetido para o periódico *Acta Biomaterialia*.

Almeida ALG, **Freitas GP**, Lopes HB, Gimenes R, Siessere, S, Sousa LG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells combined with a polymer/ceramic membrane on osteoporotic bone repair. Artigo submetido para o periódico *Calcified Tissue International*.

4. Resumos publicados em anais de congressos

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Souza LG, Siéssere S, Beloti MM, Rosa AL. Cells and biomaterial for bone repair under osteoporotic conditions. *Academy of Dental Materials Annual Meeting 2017. Dental Materials*, 2017. v. 33, p. 34-34.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Gimenes R, Beloti MM, Rosa AL. Effect of locally injected osteoblasts combined with a barrier membrane on the repair of bone defects. *10th World Biomaterials Congress. WBC*, 2016. v. 10, p. 2200-2200.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Souza LG, Siéssere S, Regalo S, Beloti MM, Rosa AL. Effect of bioactive glass-ceramic scaffold associated with bone marrow or adipose-derived mesenchymal stem cells on bone formation under osteoporotic conditions, 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress. Bone Abstracts, 2016. v. 5, p. 53-53.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Bone formation in calvarial defects treated with mesenchymal stem cells or osteoblasts derived from adipose tissue: microtomographic analysis. American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016. Molecular Biology of the Cell, 2016. v. 15, p. 515.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Gimenes R, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Potencial de osteoblastos derivados de medula óssea e tecido adiposo associados a compósito de polímero/cerâmica para reparar tecido ósseo. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30, p. 72-72.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG; Beloti MM, Rosa AL. Bone formation in rat calvarial defects treated with poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/ barium titanate membrane and bone marrow MSCs infusion. Brazil MRS Meeting 2015, XIV Brazil MRS Meeting, 2015. p. w-3-w-3.

5. Resumos publicados em anais de congressos (co-autoria)

Rosa AL, **Freitas GP**, Lopes HB, Beloti MM. Cell therapy strategy for enhancing bone formation. 10th World Congress and Expo on Cell & Stem Cell Research. Journal of Cell Science and Therapy, 2018. v. 31, p. 164-164.

Beloti MM, Lopes HB, **Freitas GP**, Rosa AL. Effect of integrin alpha v silencing on osteoblastic differentiation induced by titanium with nanotopography. 2018 Annual Meeting & Exposition. Society for Biomaterials, 2018.

Ferraz EP, Crovace M, **Freitas GP**, Peitl-filho O, Zanotto E, Beloti MM, Rosa AL. A novel bioactive glass-ceramic scaffold for bone regeneration. 6th China-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine. Regenerative Medicine, 2017. v. 1, p. 149-150.

Souza ATP, Lopes HB, **Freitas GP**, Ferraz EP, Fernandes RR, Beloti MM, Rosa AL. Avaliação do potencial osteogênico de células osteoblásticas provenientes de origens embrionárias distintas. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral Research, 2017. v. 31, p. 82-82.

Lopes HB, Fantacini DM, **Freitas GP**, Picanco-Castro V, Covas DT, Elias CN, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Participation of Itgav on osteoblast induction by titanium with nanotopography. Academy of Dental Materials Annual Meeting 2017. Dental Materials, 2017. v. 33, p. 48-48.

Bezerra B, Souza ATP, Oliveira FS, **Freitas GP**, Lima J, Rosa AL, Beloti MM. Efeito de BMP9 sobre a expressão de marcadores osteoblásticos em células da linhagem MC3T3-E1. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral research, 2017. v. 31, p. 142-142.

Souza ATP, **Freitas GP**, Lopes HB, Beloti MM, Rosa AL. Terapia celular: formação óssea induzida por células-tronco mesenquimais ou osteoblastos. XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial. Journal of the Brazilian College of Oral and Maxillofacial Surgery, 2017. v. 3, p. 297-297.

Almeida ALG, **Freitas GP**, Lopes HB, Crovace M, Peitl-Filho O, Siessere S, Oliveira PT, Rosa AL. Efeito da associação de células-tronco mesenquimais e arcabouços de bioS-2p no reparo de defeitos ósseos em ratas osteoporóticas. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30. p. 70-70.

Minari VA, **Freitas GP**, Lopes HB, Almeida ALG, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, injetadas localmente, no reparo do tecido ósseo. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30, p. 114-114.

Souza ATP, **Freitas GP**, Almeida ALG, Gimenes R, Siessere S, Souza LG, Beloti MM, Rosa AL. Avaliação da associação de células-tronco mesenquimais e membrana de PVDF no reparo de defeitos ósseos em ratas osteoporóticas. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas. Brazilian Oral Research, 2016. v. 30, p. 72-72.

Lopes HB, **Freitas GP**, Florio P, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Regulation of genes involved in the integrin signaling pathway induced by titanium with nanopography. 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress. Bone Abstracts, 2016. v. 5, p. 142-142.

Almeida ALG, Souza ATP, **Freitas GP**, Lopes HB, Crovace M, Peitl-filho O, Souza LG, Siessere S, Beloti MM, Rosa AL. Bone formation in calvarial defects of osteoporotic rats implanted with bioactive glass-ceramic associated with mesenchymal stem cells. Annual Meeting American Society for Cell Biology 2016. Molecular Biology of the Cell, 2016. v. 15, p. 517.

Abuna RPF, Lopes HB, Oliveira FS, **Freitas GP**, Ramos JIR, Beloti MM, Rosa AL. Validation of reference genes to study osteoblastic cells using qPCR. Annual Meeting American Society for Cell Biology 2016. Molecular Biology of the Cell, 2016. v. 15, p. 566.

Ferraz EP, Crovace M, **Freitas GP**, Almeida ALG, Oliveira PT, Beloti MM, Peitl-Filho O, Rosa AL. A novel bioactive glass-ceramic scaffold for bone tissue engineering. XIV Brazilian MRS Meeting 2015. XIV Brazilian MRS Meeting, 2015. p. w-3-w-3.

Ferraz EP, Almeida AL, **Freitas GP**, Crovace M, Peitl-Filho O, Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. In vitro and in vivo evaluations of a bioactive glass scaffold (BIO-SCA) for bone regeneration. IV International Conference on Tissue Engineering. IV International Conference on Tissue Engineering, 2015. p. 56-56.

Ferraz EP, **Freitas GP**, Lopes HB, Crovace M, Peitl-Filho O, Beloti MM, Rosa AL. Effect of bioactive glass scaffold combined with mesenchymal stem cells or osteoblast on bone repair. World Conference on Regenerative Medicine 2015. Regenerative Medicine Abstract, 2015. p. 56.

6. Realização de Estágio no Exterior

Universidade de Vermont, EUA

Stein & Lian Lab

Período: 01/04/2017 à 31/03/2018

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE): processo FAPESP nº 2016/23850-8.

Supervisora: Prof. Dra. Jane B. Lian

Título do projeto: Gene therapy for bone regeneration using CRISPR-Cas9 system

Apêndices

APÊNDICE A

Figura suplementar 1. Reconstruções 3D geradas por micro-CT (A-C) e parâmetros (D-E) da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de 5×10^4 , 5×10^5 ou 5×10^6 CTMs-MO/defeito em 4 semanas ($n=12$). A porcentagem de volume ósseo (D) e o número de trabéculas (E) mostraram correlação positiva com a quantidade de células injetadas. Barra: A-C = 1,25 mm.

APÊNDICE B

Figura suplementar 2. Reconstruções 3D geradas por micro-CT e parâmetros da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com uma injeção local de CTMs-MO (A), duas injeções locais de CTMs-MO (B) ou quatro injeções locais de CTMs-MO (C) em 4 semanas ($n=12$). Os parâmetros volume ósseo (D), porcentagem de volume ósseo (E), superfície óssea (F), módulo de elasticidade (G) e dureza (H) mostraram correlação negativa com o número de injeções. Barra: A-C = 1,25 mm.

APÊNDICE C

Figura 15. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.

APÊNDICE D

Figura 16. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-TA em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.

APÊNDICE E

Figura 17. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de solução salina tamponada (PBS) sem células (Controle) em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.

APÊNDICE F

Figura 18. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-MO em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.

APÊNDICE G

Figura 19. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de OBs-TA em 4 semanas (n=12). Barra = 1,25 mm.