UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

THIAGO DE SANTANA SANTOS

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR COM A ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E OSTEÓBLASTOS NO REPARO DO TECIDO ÓSSEO**

PG-PERIO
FOP-USP

Ribeirão Preto

2014

THIAGO DE SANTANA SANTOS

**EFEITOS DA TERAPIA CELULAR COM A ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E OSTEÓBLASTOS NO REPARO DO TECIDO ÓSSEO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), área de concentração Cirurgia-Buco-Maxilo-Facial, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Santos, Thiago de Santana

Efeitos da Terapia Celular com a Associação de Células-Tronco Mesenquimais e Osteoblastos no Reparo do Tecido Ósseo, 2014.

100 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Osteoblastos. 3. Cultura de células. 4. Tecido ósseo. 5. Reparação óssea. 6. Terapia celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago de Santana Santos

Efeitos da Terapia Celular com a Associação de Células-Tronco Mesenquimais e Osteoblastos no Reparo do Tecido Ósseo

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), área de concentração Cirurgia-Buco-Maxilo-Facial, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular e 3D BIO, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos Nos. 2011/00617-2 e 2011/00919-9.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que mais me deram apoio: meu pai e minha mãe. Não tenho palavras para agradecer tudo que me proporcionaram por toda a vida. Ao longo desses anos, pouco os vi, mas, cada momento em que estivemos juntos foi o suficiente para saber quanta falta eu sinto aqui, longe de vocês. Sei que estão sempre fazendo o máximo por mim e por minha irmã. Agradeço a Deus por ter vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar o meu caminho a todo momento, colocando pessoas que me ajudam a vencer os obstáculos que constantemente enfrentamos na vida.

A Aline, por todo apoio, companheirismo, carinho e viagens para estar do meu lado. Mesmo distantes durante esses três anos, a sensação é de que estávamos próximos devido ao sentimento que nos une. Isso foi imprescindível para estimular o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, muito obrigado pela paciência e orientação, assim como, por ter-me proporcionado a grande oportunidade de aprender a ser um pesquisador. Isso contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional. Hoje, eu reconheço a importância de ter sido orientado por um profissional tão dedicado à pesquisa e ímpar nos trabalhos que realiza. A cada conversa que tínhamos, a sensação que ficava era de que tinha aprendido algo a mais.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, muito obrigado pela paciência e orientação, assim como, por toda ajuda durante a realização deste trabalho e por permitir minha participação em trabalhos científicos com seus alunos.

Ao Prof. Dr. Samuel Porfirio Xavier, por todo apoio e oportunidades em participar de trabalhos científicos com seus alunos.

A todos professores que convivi durante o Doutorado: Dr. Alexandre Elias Trivellato, Dr. Cássio Edvard Sverzut, Dr. Luiz Antônio Salata, Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, por todo aprendizado durante as disciplinas.

Às Profas. Dra. Selma Siessére e Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado pela aceitação na banca de qualificação e palavras de apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, Dimitrius Leonardo Pitó, Fabíola Singaretti de Oliveira, Luiz Gustavo de Souza, Milla Sprone Tavares e Roger Rodrigo Fernandes e aos

ex-funcionários Samuel Santoro e Christopher Oliveira, pela amizade e pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia: Tatiana Angeli Passos Fernandes, Aparecida Dulce de Oliveira Negreti e Carla Daniela Lima da Silva, por todo auxílio e atenção.

A Felipe Perraro Seh e Rafael Rodrigues Dias, amigos adquiridos durante a pós-graduação, por todas cirurgias que realizamos, assim como, momentos de estudo e descontração.

A Emanuela Prado Ferraz, por ensinar-me procedimentos laboratoriais quando comecei este trabalho, assim como, pela ajuda em outros trabalhos científicos que realizamos.

A Larissa Moreira Spínola de Castro-Raucci, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, paciência, amizade e demonstração de dedicação à pós-graduação.

Ao Lucas Novaes Teixeira, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e amizade.

A Rodrigo Abuná Paolo Flores, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como, pela grande amizade no decorrer destes dois últimos anos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células: Fernanda Grilo de Azevedo, Gabriela Caroline Alonso, Gabriela Cerminaro Rodrigues, Gileade Pereira Freitas, Helena Bacha Lopes, Larissa Sverzut Bellesini, Luciana Bastos Alves, Renan de Barros e Lima Bueno, Rogério Bentes Kato e Thiago Pompermaier Garlet, pelos bons momentos compartilhados durante estes três anos.

Aos professores e amigos, Dra. Marta Rabello Piva e Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva, que me estimulam à docência desde a graduação na Universidade Federal de Sergipe.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao trabalho e pela concessão da bolsa de doutorado.

E a todos que fizeram parte do meu desenvolvimento pessoal e profissional durante a realização deste trabalho e que não foram citados.

“...I was just guessing at numbers and figures

Pulling the puzzles apart

Questions of science, science and progress...

...Nobody said it was easy...

...No one ever said it would be this hard...”

(The Scientist; Chris Martin – Coldplay)

RESUMO

Santos TS. **Efeitos da terapia celular com a associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos no reparo do tecido ósseo** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2014. 100p.

A regeneração de defeitos ósseos continua sendo um grande desafio na área de Odontologia e Medicina. É bem estabelecido que células-tronco mesenquimais (CTMs) e osteoblastos (OBs) desempenham um papel crítico na osteogênese, tornando-se candidatos a utilização em procedimentos de terapia celular que visam otimizar o processo de reparação óssea. Porém, pouco se sabe sobre a interação entre CTMs e OBs, e a maioria dos estudos enfatiza o efeito dos OBs sobre CTMs, fazendo com que a influência das CTMs na atividade osteogênica dos OBs continue sendo uma questão desafiadora. Baseados em nossos estudos anteriores, formulamos a hipótese de que a terapia celular que fizesse uso de uma associação de CTMs e OBs poderia ser mais eficaz para o reparo do tecido ósseo do que essas células isoladamente, principalmente como resultado da estimulação de OBs por CTMs. Para tal, foi realizado estudo *in vitro* para avaliar os efeitos das CTMs sobre os OBs e *in vivo* para avaliar os efeitos dessas células, isoladamente e combinadas, sobre a reparação óssea. CTMs da medula óssea de rato foram cultivadas em meio de crescimento para manterem-se como CTMs ou em meio osteogênico para diferenciarem-se em OBs. Após alcançar a subconfluência, as células foram cultivadas *in vitro* em três diferentes condições: (1) co-cultura direta de CTMs e OBs usando três proporções celulares (1:1, 1:2 e 2:1), (2) co-cultura indireta de CTMs e OBs usando insertos e (3) OBs cultivados em meio condicionado por CTMs. Para

avaliação das respostas celulares foram realizados ensaios de proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz mineralizada, expressão gênica de marcadores osteoblásticos, imunolocalização de sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN) e migração celular. Para os experimentos *in vivo*, as células foram carregadas em esponja de colágeno através de vários ciclos de centrifugação. Após, defeitos ósseos em calvária de rato foram preenchidos com (1) esponja de colágeno sem células, (2) esponja de colágeno com CTMs, (3) esponja de colágeno com OBs e (4) esponja de colágeno com associação de CTMs e OBs. Para avaliação da reparação óssea *in vivo* após 4 semanas, foram realizadas análises histomorfométricas através de cortes histológicos e microtomografia computadorizada. Os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e, se necessário pelo teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Foi observado que CTMs têm efeito repressivo sobre a proliferação e as expressões fenotípicas e genotípicas de OBs ($P \leq 0,05$). Em relação ao reparo dos defeitos ósseos, somente naqueles tratados com células observou-se formação óssea predominantemente como ilhotas isoladas e diferenças, principalmente qualitativas, entre os tipos celulares utilizados, com tendência de maior formação óssea em defeitos tratados com OBs em comparação ao uso de CTMs. Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que as CTMs apresentam efeito inibitório sobre OBs e que a terapia celular com OBs parece ser mais eficaz no reparo do tecido ósseo.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; osteoblastos; cultura de células; tecido ósseo; reparação óssea; terapia celular.

ABSTRACT

Santos TS. **Effects of cell therapy with association of mesenchymal stem cells and osteoblasts in bone tissue repair** [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2014. 100p.

The regeneration of bone defects remains a major challenge in the field of Dentistry and Medicine. It is well known that mesenchymal stem cells (MSCs) and osteoblasts (OBs) play critical roles in osteogenesis, making them promising alternatives to be employed in cell therapy procedures to enhance the process of bone regeneration. Studies about the crosstalk between MSCs and OBs are mainly focused on the effect of OBs on MSCs, thus how MSCs may affect OBs phenotype expression remains a challenging question. Based on our previous studies, we have hypothesized that cell therapy using a combination of MSCs and OBs could be more effective for the bone repair than these cells separately, mainly due to the stimulation of OBs by MSCs. For this, we carried out *in vitro* experiments to evaluate the effects of MSCs on the OBs and *in vivo* experiments to assess the effects of these cells either isolated or combined on bone repair. Rat bone marrow MSCs were cultured either in growth medium to keep MSCs features or in osteogenic medium to differentiate into OBs. After reaching subconfluence, cells were grown *in vitro* in three different conditions: (1) direct coculture of MSCs and OBs using three cell proportions (1:1, 1:2 and 2:1), (2) indirect coculture of MSCs and OBs using transwell porous filters and (3) OBs cultured in MSCs conditioned medium. Cell responses were evaluated by assaying cell proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), mineralized matrix formation, gene expression of osteoblast markers, immunolocalization of bone sialoprotein (BSP) and

osteopontin (OPN), and cell migration. For *in vivo* experiments, cells were seeded into collagen sponge by a centrifugation method. After, calvarial defects were implanted with (1) collagen sponge without cells, (2) collagen sponge with MSCs, (3) collagen sponge with OBs, and (4) collagen sponge and association of MSCs with OBs. To evaluate bone repair at the end of 4 weeks, histomorphometric analyzes were carried out using histological slides and micro-computed tomography. Data were compared by Kruskal-Wallis test and, if appropriated, by Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$). It was observed that MSCs repressed proliferation, phenotypic and genotypic expressions of OBs ($P \leq 0.05$). Bone formation was observed only in cell treated defects as isolated islets and qualitative differences were noticed among cell types, with a tendency of more bone formation in OBs treated defects compared with MSCs ones. Based on these results, we can conclude that MSCs exhibited inhibitory effect on OBs and that cell therapy with OBs seemed to be more effective for bone repair.

Keywords: Mesenchymal stem cells; osteoblasts; cell culture; bone tissue; bone repair; cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colocação da esponja de colágeno na calvária de rato.....**45**

Figura 2. Proliferação das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 3, 7 e 10 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**51**

Figura 3. Atividade de ALP das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 7, 10 e 14 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**52**

Figura 4. Formação de matriz mineralizada das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 17 e 21 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada. B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**53**

Figura 5. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs em diferentes proporções aos 10 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4).....**54**

Figura 6. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs/OBs 1:1; D) CTMs/OBs 1:2; E) CTMs/OBs 2:1.....**56**

Figura 7. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência verde indica imunolocalização de OPN. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em fluorescência azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs/OBs 1:1; D) CTMs/OBs 1:2; E) CTMs/OBs 2:1.....**57**

Figura 8. Expressão da proteína RUNX2 das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 10 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1.....**58**

Figura 9. Proliferação das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 3, 7 e 10 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).....**58**

Figura 10. Atividade de ALP das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 10 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).....**59**

Figura 11. Formação de matriz mineralizada das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 17 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada; B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).....**60**

Figura 12. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 10 dias.

Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).....61

Figura 13. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 µm. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs→OBs.....63

Figura 14. Porcentagem de células que migraram através dos insertos em CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1 com insertos aos 10 dias. Legendas: CTMs = Migração de CTMs para poço sem células; OBs = migração de OBs para poço sem células; $\frac{OBs}{CTMs}$ = migração de OBs em direção a CTMs no poço; $\frac{CTMs}{OBs}$ = migração de CTMs em direção a OBs no poço. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=5).....64

Figura 15. Micrografia da migração das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1 com insertos aos 10 dias. Barra de escala = 100 µm. Legendas: CTMs = Migração de CTMs para poço sem células; OBs = migração de OBs para poço sem células; $\frac{OBs}{CTMs}$ = migração de OBs em direção a CTMs no poço; $\frac{CTMs}{OBs}$ = migração de CTMs em direção a OBs no poço. A) CTMs; B) OBs; C) $\frac{OBs}{CTMs}$; D) $\frac{CTMs}{OBs}$64

Figura 16. Proliferação de OBs cultivados por 3, 7 e 10 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**65**

Figura 17. Atividade de ALP de OBs de OBs cultivados por 7, 10 e 14 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**66**

Figura 18. Formação de matriz mineralizada de OBs cultivados por 17 e 21 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada. B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).....**67**

Figura 19. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos em OBs cultivados por 10 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na

proporção 1:1. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4).....68

Figura 20. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. A) OBs (MC); B) OBs (MCo).....69

Figura 21. Imagens microtomográficas (A-C) e fotomicrografias (D-F) de defeitos ósseos, criados em calvárias de ratos, não-preenchidos (A, D) ou preenchidos com esponja de colágeno (B, E) ou com fibrina (C, F), 4 semanas pós-implantação. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A-C = 2,5 mm; D-F = 800 μ m. CONT: controle; COL: esponja de colágeno; FIBR: fibrina. A) CONT; B) COL; C) FIBR; D) CONT; E) COL; F) FIBR.....70

Figura 22. Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de microtomografias computadorizadas reconstruídas de nova formação óssea em defeitos de calvária de ratos não-preenchidos e preenchidos com esponja de colágeno ou fibrina em 4 semanas. A) Volume ósseo; B) Porcentagem de volume ósseo; C) Superfície óssea; D) Proporção superfície/volume ósseo; E) Espessura trabecular; F) Número de trabéculas; G) Separação trabecular. Letras diferentes significam

diferença estatisticamente significativa entre os grupos
($P \leq 0,05$).....71

Figura 23. A) Células carregadas na esponja de colágeno. O número de células carregadas aumentou gradualmente com a progressão dos ciclos de centrifugação. Dados são expressos como número de células e reportados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$); B) Viabilidade celular relacionada ao número dos ciclos de centrifugação e ressuspensão. Dados são expressos como porcentagem de células viáveis e reportadas como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). C) Células coradas com MTT são verificadas nas paredes internas da esponja de colágeno cortada transversalmente. CTMs: células-tronco mesenquimais; OBs: osteoblastos; CTMs/OBs: associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos.....72

Figura 24. Imagens microtomográficas (A-D) e fotomicrografias (E-L) de defeitos ósseos, criados em calvárias de ratos, preenchidos com esponjas de colágeno não-associadas (A, E, I) ou associadas a CTMs (B, F, J), OBs (C, G, K) ou CTMs/OBs (D, H, L), 4 semanas pós-implantação. Os defeitos ósseos tratados com esponjas de colágeno não carregadas com células foram preenchidos por tecido conjuntivo e uma discreta formação óssea ocorreu nas bordas dos defeitos (E). Uma maior formação óssea foi observada nos defeitos ósseos tratados com esponjas de colágeno associadas a células (F-H). As cabeças de seta indicam linha cimentante entre osso lamelar e osso imaturo (I), remanescente da esponja de colágeno (J) e camada de osteoblastos revestindo a matriz extracelular em processo de mineralização (K). Os asteriscos indicam vasos sanguíneos (K, L). Os detalhes histológicos descritos

estavam presentes em todos os defeitos ósseos independentemente do tipo de tratamento a que foram submetidos. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A-D = 2,5 mm; E-H = 800 µm; I-L = 100 µm. COL: esponja de colágeno; COL+CTMs: esponja de colágeno carregada com células-tronco mesenquimais; COL+OBs: esponja de colágeno carregada com osteoblastos; COL+CTMs/OBs: esponja de colágeno carregada com associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos; ol: osso lamelar; oi: osso imaturo. A) COL; B) COL+CTMs; C) COL+OBs; D) COL+CTMs/OBs; E) COL; F) COL+CTMs; G) COL+OBs; H) COL+CTMs/OBs; I) COL; J) COL+CTMs; K) COL+OBs; L) COL+CTMs/OBs.....74

Figura 25. Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de microtomografias computadorizadas reconstruídas de nova formação óssea em defeitos de calvária de ratos preenchidos com esponja de colágeno ou esponja de colágeno carregada com células em 4 semanas. CTMs: células-tronco mesenquimais; OBs: osteoblastos; CTMs/OBs: associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos. A) Volume ósseo; B) Porcentagem de volume ósseo; C) Superfície óssea; D) Proporção superfície/volume ósseo; E) Espessura trabecular; F) Número de trabéculas; G) Separação trabecular. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das análises estatísticas da expressão dos genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs. São mostrados os genes avaliados, a significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre culturas mostradas pelo teste de Mann-Whitney.....**55**

Tabela 2. Resultados das análises estatísticas da expressão dos genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs. São mostrados os genes avaliados, a significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre culturas mostradas pelo teste de Mann-Whitney.....**62**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 PROPOSIÇÃO	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Ensaaios <i>in vitro</i>	31
3.1.1 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais e osteoblastos	31
3.1.2 Co-culturas diretas	32
3.1.3 Co-culturas indiretas	33
3.1.4 Culturas com meio condicionado	33
3.1.5 Avaliação das respostas celulares	34
3.1.5.1 Proliferação celular	34
3.1.5.2 Atividade de ALP	34
3.1.5.3 Formação de matriz mineralizada	35
3.1.5.4 Expressão gênica	36
3.1.5.5 Imunolocalização de proteínas	38
3.1.5.6 Expressão protéica	39
3.1.5.7 Migração celular	42
3.2 Ensaaios <i>in vivo</i>	43
3.2.1 Seleção do arcabouço para carreamento das células	43
3.2.1.1 Procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo	44
3.2.1.2 Eutanásia e coleta de material para análises	45
3.2.1.3 Microtomografia computadorizada	45
3.1.2.4 Análise histológica	46
3.2.2 Efeito das células na reparação de defeitos ósseos	47
3.2.2.1 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais e osteoblastos derivados da medula óssea de ratos	47
3.2.2.2 Carreamento das células por centrifugação	47
3.2.2.3 Colocação da esponja de colágeno com células em defeitos ósseos	48
3.2.2.4 Eutanásia e coleta de material para análises	49
3.3 Análise estatística	49
4 RESULTADOS	51

4.1 Ensaio <i>in vitro</i>	51
4.1.1 Co-culturas diretas	51
4.1.2 Co-culturas indiretas	58
4.1.3 Culturas com meio condicionado	65
4.2 Ensaio <i>in vivo</i>	69
4.2.1 Seleção do arcabouço para carreamento das células	69
4.2.2 Carreamento das células	72
4.2.3 Efeitos das células na reparação de defeitos ósseos	73
 5 DISCUSSÃO	 78
 6 CONCLUSÃO	 87
 REFERÊNCIAS	 88
 ANEXOS	 97

1 INTRODUÇÃO

A regeneração de defeitos ósseos resultantes de traumas ou processos patológicos ainda constitui um grande desafio nas áreas da Odontologia e Medicina, pois quando há defeitos de grande extensão ou o metabolismo ósseo está alterado (por exemplo, osteoporose e Doença de Paget), o tecido ósseo torna-se incapaz de promover reparo adequado. Logo, torna-se necessário otimizar as condições em que ocorre o processo de reparação óssea. Para isso, diferentes formas de tratamento como enxertos ósseos, biomateriais e células têm sido empregadas (GREENBAUM e KANAT, 1993; LYNCH et al., 2008).

Em relação aos enxertos ósseos, os autógenos são considerados o padrão-ouro no tratamento de defeitos ósseos devido a suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (HAUSAMEN e NEUKAM, 1992). Além disso, os enxertos autógenos possuem como vantagens adicionais uma rede vascular estabelecida e ausência de potencial de transmissão de doenças. Porém, seu uso está associado a desvantagens como uma maior morbidade, por necessitar de um sítio cirúrgico doador, demandar maior tempo operatório, quantidade disponível limitada e dificuldade de modelar o enxerto no defeito ósseo (GAZDAG et al., 1995).

Além do osso autógeno, enxertos ósseos alógenos (cadáver) e xenógeno (animais) têm sido utilizados. Apesar desses enxertos serem disponíveis sem necessidade de intervenção cirúrgica e em quantidade ilimitada, apresentam desvantagens como risco de reação do hospedeiro devido a diferenças genéticas, risco de transmissão de doenças e questionamentos éticos e religiosos (DAMIEN e PARSONS, 1991; GARBUZ et al., 1998).

Os biomateriais sintéticos utilizados como substitutos ósseos (cerâmicos, metálicos, polímeros e compósitos) constituem uma outra alternativa para evitar a morbidade associada aos enxertos autógenos e os riscos da utilização dos enxertos alógenos e xenógenos. Todavia, esses biomateriais não possuem as propriedades de osteoindução e osteogênese, servindo somente de arcabouço para a formação óssea (STOCKMANN et al., 2012). Ademais, o emprego dos biomateriais sintéticos em defeitos ósseos tem sido associado a problemas como: baixa taxa de biodegradação, ausência de poros interconectados, baixa afinidade para macromoléculas da matriz e falta de estímulo mecânico ao osso circundante, resultando em maior reabsorção óssea (LANZA et al., 2013).

Nota-se, portanto, que dentre enxertos e biomateriais como opções de tratamento para defeitos ósseos, o enxerto autógeno apresenta maior potencial osteogênico. Sendo que, em grande parte, o sucesso desses enxertos no tratamento de defeitos ósseos deve-se à presença de células (osteogênese) e fatores de crescimento (osteoindução) (JANICKI e SCHMIDMAIER, 2011). Em razão disso, entre as várias alternativas de regeneração óssea, a utilização de células tem sido considerada bastante promissora. Além disso, essa estratégia tem sido empregada, com relativo sucesso, no tratamento de doenças autoimunes, alterações cardíacas, renais, hepáticas, musculoesqueléticas e da pele (CATERSON et al., 2001; BARTHOLOMEW et al., 2002; POULSOM et al., 2003; COLLINS e RUSSELL, 2009; IKEHARA, 2010; STUTCHFIELD et al., 2010).

Independentemente do tipo de tratamento para defeitos ósseos, a reparação resulta da associação de fatores celulares e humorais envolvidos na formação de novo osso, atuando de forma análoga ao desenvolvimento embrionário do esqueleto. Para tal, há a participação de diversos tipos celulares, como células inflamatórias,

fibroblastos, condroblastos, células-tronco mesenquimais (CTMs), osteoblastos (OBs), osteócitos e osteoclastos. Várias dessas células são recrutadas por quimiotaxia para o sítio danificado através da liberação de fatores químicos da matriz óssea danificada e de plaquetas (OE et al., 2007).

De maneira geral, a regeneração óssea utilizando células pode ser dividida em terapia celular e engenharia tecidual. A terapia celular envolve somente a utilização de células para a regeneração do tecido ósseo enquanto a engenharia tecidual utiliza a combinação de células com biomateriais, que servem como uma plataforma para carregamento das células e dos fatores de crescimento (ROSA et al., 2008).

Dentre os diversos tipos celulares que podem ser utilizados, as CTMs também chamadas de células multipotentes estromais, têm sido as mais estudadas. Elas foram identificadas primeiramente na medula óssea, mas podem ser encontradas em diferentes sítios, tais como: baço, cordão umbilical, fígado, músculo, osso, placenta, polpa dental, pulmões, sangue, tecido adiposo, tendões, sinóvia, dentre outros (FRIEDENSTEIN et al., 1976; DE BARI et al., 2001; ZUK et al., 2001; ROMANOV et al., 2003; FUKUCHI et al., 2004; BI et al., 2007; BELOTI et al., 2012; WANG et al., 2013). Tem sido sugerido ainda que as CTMs poderiam virtualmente residir em todos órgãos e tecidos pós-natais (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). No entanto, as células derivadas da medula óssea têm sido mais utilizadas, baseado principalmente na quantidade de CTMs presentes (1/1.000.000 células nucleadas), na facilidade de obtenção e em seu maior potencial de diferenciação em vários tipos celulares como adipócitos, condrócitos, osteoblastos e mioblastos (PROCKOP, 1997; IN 'T ANKER et al., 2003).

Já foi verificado que após implantação *in vivo*, as células-tronco são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares mesmo na ausência de qualquer injúria (ANJOS-AFONSO et al., 2004), sugerindo que a diferenciação dessas células pode contribuir para a regeneração dos tecidos lesados. Por outro lado, a baixa porcentagem de enxertamento das células-tronco injetadas (menos de 1%) e o fato de as mesmas não serem encontradas após longos períodos após a injeção, sugerem que seus efeitos devem-se mais a sua capacidade de secretar fatores solúveis que alteram o microambiente e, conseqüentemente, as células vizinhas, estimulando-as a reparar os tecidos danificados (PROCKOP, 1997; UNDALE et al., 2009). Dessa forma, as CTMs têm seu potencial terapêutico devido à possibilidade de diferenciação multipotente, e secreção de várias citocinas e fatores de crescimento que conferem a elas propriedades anti-fibróticas, anti-apoptóticas, pró-angiogênese e imunomodulatórias (SENSEBE et al., 2011).

As CTMs são ainda consideradas células imunologicamente privilegiadas, pois suas propriedades imunomodulatórias estão relacionadas com sua habilidade de suprimir o estímulo à proliferação dos linfócitos T, mediado, em parte por fatores solúveis e/ou falta de receptores de superfície (BARTHOLOMEW et al., 2002; DI NICOLA et al., 2002). Estudos prévios atribuíram a essas propriedades, os resultados positivos do uso de CTMs para redução de doenças do enxerto contra hospedeiro e para o tratamento eficaz de desordens autoimunes (BARTHOLOMEW et al., 2002; LE BLANC et al., 2004).

Atualmente, com o objetivo de regenerar defeitos ósseos, a terapia celular com CTMs tem sido aplicada através de diferentes técnicas: (1) aspirado de medula óssea, (2) concentração do aspirado de medula óssea, (3) concentração da fração mononuclear da medula óssea e (4) cultura de CTMs a partir da medula óssea. A

despeito da pronta utilização das três primeiras técnicas citadas, a cultura de CTMs tem a vantagem de permitir o emprego de maior número de células osteoprogenitoras (SAKAI et al., 2008; SAUERBIER et al., 2010).

A terapia com células-tronco derivadas de medula óssea, diferenciadas ou não em OBs, tem sido utilizada no tratamento de não-união crônica de fraturas, osteoartrite, osteonecrose, defeitos articulares de cartilagem e doenças ósseas metabólicas, tais como, osteogênese imperfeita e hipofosfatasia, com resultados bastante promissores (LEE et al., 2003; UNDALE et al., 2009; AUNG et al., 2011; CHEN et al., 2012). De acordo com os resultados dos estudos de Hernigou et al. (2005a, 2005b), Kim et al. (2009) e Beloti et al. (2012) tanto CTMs derivadas da medula óssea como aquelas diferenciadas em OBs são capazes de induzir a reparação óssea. Em relação ao grau de diferenciação osteoblástica, há consenso em que OBs mais diferenciados têm reduzida capacidade de regeneração de defeitos ósseos (CASTANO-IZQUIERDO et al., 2007; BELOTI et al., 2012). Por outro lado, enquanto Castano-Izquierdo et al. (2007) demonstraram que o uso de OBs em estágio inicial de diferenciação resultou em maior formação óssea, Beloti et al. (2012) mostraram que CTMs e OBs pouco diferenciados são igualmente eficazes.

Apesar de ambos os tipos celulares contribuírem para a regeneração óssea, pouco se conhece sobre a interação entre eles. A literatura tem dado ênfase ao estudo da influência de OBs sobre CTMs (GERSTENFELD et al., 2002; HEINO et al., 2004; CSAKI et al., 2009; ILMER et al., 2009; BIRMINGHAM et al., 2012; TSAI et al., 2012; YU et al., 2014), com evidências de que a indução de marcadores osteoblásticos em CTMs é mais acentuada por estímulos provenientes de osteócitos (BIRMINGHAM et al., 2012). Por outro lado, apenas dois estudos avaliaram a influência de CTMs sobre OBs, um deles utilizando modelo de co-cultura direta (KIM et al., 2003) e o outro

utilizando meio condicionado por CTMs sobre OBs (SUN et al., 2012), mas nenhum deles utilizou o modelo de co-cultura indireta.

As evidências acima sugerem que ambos os tipos celulares, CTMs e OBs, contribuem para a formação óssea e que existe interação entre esses tipos celulares. Portanto, formulamos a hipótese de que a terapia celular que fizesse uso de uma associação de células indiferenciadas (CTMs) e diferenciadas (OBs) poderia ser mais eficaz para o reparo do tecido ósseo do que essas células isoladamente, principalmente como resultado da estimulação de OBs por CTMs. Para testar nossa hipótese, realizamos estudos *in vitro* para avaliar os efeitos das CTMs sobre os OBs e *in vivo* para avaliar os efeitos dessas células isoladamente e combinadas sobre a reparação óssea.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da associação das CTMs e OBs no comportamento dos OBs em diferentes modelos de cultura de células e no carreamento dessas células para a reparação de defeitos ósseos em calvária de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos das CTMs sobre OBs utilizando modelos de co-cultura direta, co-cultura indireta e cultura em meio condicionado;
- Avaliar *in vivo* o efeito da terapia celular utilizando CTMs e OBs, isoladamente ou associadas, sobre o reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 13.1.120.53.1 (Anexo A).

3.1 Ensaios *in vitro*

Para avaliar o efeito das CTMs sobre a diferenciação osteoblástica das culturas de OBs foram utilizados dois modelos de co-cultura, direta e indireta, e um modelo de cultura com meio condicionado por CTMs.

3.1.1 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais e osteoblastos

Para obtenção de células, CTMs foram isoladas de medula óssea de fêmures de ratos Wistar com 4 semanas de vida e massa corporal variando entre 100 e 150 g, como descrito por Maniatopoulos et al. (1988). Os ratos foram eutanasiados por sobredose dos anestésicos Ketamina (Agener União, Brasil) e Xilazina (Dopaser Calier, Brasil) e os fêmures retirados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM, Gibco, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco, EUA) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco, EUA). 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 meio de irrigação com meio de crescimento contendo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), 50 μ g/mL de gentamicina e 0,3 μ g/mL de fungisona. As células da medula óssea foram mantidas em cultura durante 3 dias para permitir a seleção das CTMs, por aderência ao poliestireno, e a expansão das culturas. Após

esse período, durante mais 3 dias, algumas culturas foram mantidas em meio de crescimento para manterem-se como CTMs e outras foram cultivadas em meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco, EUA), 7 mM de β-glicerofosfato (Sigma, EUA) e 10⁻⁷ M de dexametasona (Sigma, EUA). Esse meio de crescimento suplementado é chamado de meio osteogênico por induzir a diferenciação osteoblástica e, assim, permitir a obtenção de OBs, conforme descrito por Rosa et al. (2008).

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.

Quando as culturas atingiram a subconfluência, o meio de cultura foi removido e adicionada solução de tripsina à 0,25% (Gibco, EUA), 1,3 mg/mL de collagenase do tipo II (Gibco, EUA) e EDTA à 1 mM (Gibco, EUA) para obtenção de suspensão de células e realização dos experimentos descritos a seguir.

3.1.2 Co-culturas diretas

No modelo de co-cultura direta, CTMs e OBs foram misturadas (CTMs/OBs) na proporção de 1:1, 1:2 e 2:1 e cultivadas em meio osteogênico em placas de 24 poços (2 x 10⁴ células/poço). Os controles foram CTMs e OBs cultivados em meio de crescimento e meio osteogênico, respectivamente. As respostas celulares avaliadas foram: proliferação, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz mineralizada, expressão gênica, imunolocalização de proteínas e expressão protéica.

3.1.3 Co-culturas indiretas

O modelo de co-cultura indireta foi realizado utilizando insertos com filtros de 0,4 μm (Transwell, Corning, EUA). CTMs e OBs em co-cultura na proporção de 1:2 (CTMs→OBs) foram utilizados de forma que o inserto continha CTMs enquanto os OBs foram cultivados em meio osteogênico no fundo do poço. Para isso, foram utilizadas placas de 12 poços com densidades de plaqueamento para CTMs e OBs de $1,8 \times 10^4$ células/poço e $3,6 \times 10^4$ células/poço, respectivamente. Os controles foram CTMs e OBs cultivados em meio de crescimento e meio osteogênico, respectivamente. As respostas celulares avaliadas foram: proliferação, atividade ALP, formação de matriz mineralizada, expressão gênica, imunolocalização de proteína e migração.

3.1.4 Culturas com meio condicionado

O meio condicionado foi aquele meio de cultura utilizado para cultivar as CTMs. A partir da segunda troca de meio das culturas de CTMs, o meio de crescimento utilizado nestas culturas era colhido, centrifugado em tubos a 2000 rpm por 5 min e armazenados em freezer a -20°C . Este meio condicionado por CTMs foi utilizado nas culturas de OBs na proporção de 1:1 com meio osteogênico. Assim, OBs foram cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado. Como controle foram utilizados OBs cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento fresco também na proporção de 1:1. As respostas celulares avaliadas foram: proliferação, atividade de ALP, formação de matriz mineralizada, expressão gênica e imunolocalização de proteína.

3.1.5 Avaliação das respostas celulares

3.1.5.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, EUA) aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT à 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C por 4 h. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 min e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek Instruments Inc., EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A proliferação celular foi expressa como absorbância.

3.1.5.2 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada em lisados de células através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, Diagnostica SA, Brasil). Para obtenção dos lisados de células, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, EUA) aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma, EUA) e ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL dessa solução foram transferidos para os

tubos de ensaio. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 μ L de substrato e 500 μ L de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 μ L da solução padrão. Todos os tubos foram incubados a 37°C por 10 min. Após esse período, foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 μ L da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning, EUA) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm no espectrofotômetro μ Quant (Bio-Tek). A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total, obtida de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), e expressa em μ mol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.1.5.3 Formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada pela marcação com vermelho de alizarina (Sigma, EUA). Para tanto, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 min e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina a 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 min e novamente lavadas com PBS e água bidestilada. Para análise qualitativa, imagens macroscópicas das culturas aos 14 dias foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8, EUA). Para a análise quantitativa, foi realizada a extração do vermelho de alizarina: foram acrescentados em cada poço 280 μ L de ácido acético a 10% e as placas, deixadas sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi raspada e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 min e transferidos para o gelo por 5 min. Na sequência, os

tubos foram centrifugados a 13000 g por 20 min e 100 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços (Corning, EUA) contendo 40 µL de hidróxido de amônia a 10%. Por fim, a absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (Bio-tek) utilizando comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como absorbância.

3.1.5.4 Expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR). Para tanto, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen, EUA) à temperatura ambiente, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro Nanovue plus (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, EUA). Para o preparo da água, foi adicionado 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada à temperatura ambiente por 24 h e autoclavada por 30 min. O gel foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco, EUA) em 144 mL de água DEPC. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65°C e, então, foram adicionados 36 mL de formaldeído a 12,3 M (Merck, Alemanha), 7 µL de GelRed (Biotium Inc., EUA) e 20 mL de tampão de corrida, constituído de 50 mM de acetato de sódio (Merck, Alemanha), 5 mM de EDTA (Merck, Alemanha) e 100 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS, Sigma, EUA). A mistura foi despejada em

fôrmas adequadas para moldagem do gel. Para o preparo das amostras, foram adicionados 3 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida, 4 µL de formaldeído a 12,3 M e 10 µL de formamida (Merck, Alemanha). Esta mistura foi aquecida a 85°C por 10 min e, posteriormente, submetida a resfriamento a 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado o tampão de amostra, composto por 50% de glicerol (v/v), 0,25% de azul de bromofenol (m/v), 0,25% de xileno cianol (m/v) e 10 nM de EDTA em água DEPC. A eletroforese foi conduzida a 60 V durante 1 a 3 h, utilizando-se tampão de corrida. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta a 300 nm. A integridade do RNA foi verificada pela visualização de duas subunidades (18S e 28S) do RNA ribossômico presentes em organismos eucariotos. Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA). Para a reação de Real-time PCR, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems, EUA) para genes-alvo sendo as reações feitas em aparelho CFX96 (BioRad, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata (n=4), utilizando: 5 µL de Taqman Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de Taqman Gene Expression Master Mix (Sondas + Primers) e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistem em 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou 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), que permite a análise quantitativa da expressão do fator

avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A expressão do controle endógeno foi utilizada para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda Taqman utilizada. O método comparativo de 2^{-ddCt} (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das culturas dos diferentes grupos experimentais. O desenvolvimento do fenótipo osteogênico das células foi avaliado pela expressão gênica de: 1) ALP, enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular (HAMADE et al., 2003); 2) sialoproteína óssea (BSP), proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita (HUNTER e GOLDBERG, 1993); 3) osteocalcina (OC), proteína não-colágena da matriz, utilizada como marcador de osteoblastos maduros (DUCY et al., 1996); 4) osteopontina (OPN), proteína não-colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização (GOLDBERG e HUNTER, 1995); 5) Osterix (OSX), fator de transcrição essencial para diferenciação terminal de osteoblastos e formação óssea (NAKASHIMA et al., 2002); 6) runt-related transcription fator 2 (RUNX2), fator de transcrição indispensável ao comprometimento de células mesenquimais com a linhagem osteoblástica (MARIE, 2008).

3.1.5.5 Imunolocalização de proteínas

Para a imunolocalização das proteínas BSP e OPN, as culturas crescidas sobre superfícies de Thermanox (Nunc Inc., EUA) foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à temperatura ambiente. As células foram, então, processadas para imunofluorescência indireta

conforme descrito em trabalhos prévios (DE OLIVEIRA et al., 2003; DE OLIVEIRA e NANCI, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Anticorpos primários para BSP (1:200, WV1D1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank – DSHB, EUA) e OPN (1:800, MPIIB10-1, DSHB, EUA) foram utilizados, seguidos de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes, EUA), em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes, EUA) para visualização do citoesqueleto de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min em temperatura ambiente. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes, EUA) a 300 nM por 5 min. As lamínulas de Thermanox (Nunc Inc., EUA) foram fixadas em lâminas de vidro e, após a montagem de lamínula de vidro (Fisher Scientific, EUA) com meio de montagem anti-fade (Vectashield, EUA) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas em microscópio de fluorescência Zeiss modelo AxioImager M2 (Carl Zeiss Inc., Alemanha), acoplado a uma câmera digital AxioCam MRm (Carl Zeiss Inc., Alemanha). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Software, EUA).

3.1.5.6 Expressão protéica

A expressão protéica de RUNX2 foi realizada por Western blot. Para tanto, as células foram destacadas dos poços como já descrito anteriormente, e as amostras

foram homogeneizadas, transferidas para tubos falcon e centrifugadas por 5 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células, lavadas 3 vezes com 5-10 mL de PBS aquecido. Após a última centrifugação, todo o PBS foi removido, e foi adicionado o tampão RIPA (NaCl 150 mM, Sigma-Aldrich; NP40 10%, Sigma-Aldrich; C₂₄H₃₉O₄Na 0,5%, Sigma-Aldrich; SDS 0,1%, Sigma-Aldrich; e Tris base 50 mM, pH 8, Roche, EUA). A extração da proteína total foi realizada por lise celular, utilizando-se aparelho de ultrassom (Misonix, EUA) com 5 pulsos de 10 segundos e intervalos de 10 segundos entre os pulsos. Primeiramente, determinou-se a concentração de proteínas das amostras, µg/mL, pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit comercial Protein Assay (Bio-Rad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek), com comprimento de onda de 750 nm. Foram preparados géis de poli-acrilamida 8,5% para separação das proteínas, contendo, para um volume final de 10 mL: 2,84 mL de acrilamida, 2,60 mL de tampão Tris 1,5%, pH 6,8 e SDS 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 µL de Temed e 75 µL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics, EUA). Após a polimerização do gel de separação, foi confeccionado o gel de empilhamento 5%, contendo, para um volume final de 5 mL: 0,83 mL de acrilamida, 0,13 mL de tampão Tris HCl, pH 6,8 e SDS 10%, 3,44 mL de água destilada, 12 µL de Temed e 20 µL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics, EUA). Após sua polimerização, os géis foram montados em aparato próprio e foi adicionado o tampão de corrida, composto por 3,01 g de Tris base (Roche, EUA); 14,4 g de glicina (USB Corporation, EUA) e 1 g de SDS (Sigma, EUA), para um volume final de 1 L de água destilada. Para o ensaio, 50 µg de proteína de cada grupo, contidos em um volume final de 20 µL, foram misturadas com 5 µL de tampão de amostra, contendo 7 mL de Tris base pH 6,8 (Roche, EUA), 3 mL de glicerol (Sigma,

EUA), 1 g de SDS (Sigma, EUA), 0,93 g de DTT (Sigma, EUA), 1,2 mg de bromofenol (Sigma, EUA) e 10 mL de água destilada e β -mercaptoetanol. Após aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 min, as amostras foram aplicadas nos géis, e a separação das proteínas, realizada por eletroforese com aplicação de 100 V/hora. Como referência para identificação do peso molecular das proteínas separadas, foi utilizado um marcador que identifica bandas entre 10 e 250 kDa (Bio-Rad, EUA). As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Hybond C-Extra, GE Healthcare, EUA) com o aparelho Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA), operado com 12 V por 45 min. As membranas foram submetidas a três incubações à temperatura ambiente, sendo: 1) bloqueio dos sítios inespecíficos por 3 h, com leite desnatado 5% diluído em Tampão Salino de Tris com Tween 20 (TBS-T), composto por 2,43 g de Tris, (Roche, EUA), 8 g de NaCl, (Sigma, EUA), 1 mL de Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 7,6; 2) incubação, por 3 h, com o anticorpo primário anti-RUNX2 (1:500, policlonal de coelho; Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluído em solução de leite desnatado a 2,5% em TBS-T; e 3) incubação, por 1 h, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000, cabra anti-coelho IgG HRP; Sigma, EUA) diluído em solução de leite desnatado a 2,5% em TBS-T. Ao final de cada incubação, as membranas foram lavadas três vezes, por 10 min cada, com TBS-T. Por fim, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, EUA) por 1 min e transferidas para o aparelho G:BOX (SynGene, EUA). Para a captação de imagens da banda relativa à proteína RUNX2 (88 kDa) foi utilizado o programa GeneSnap (SynGene, EUA). Como proteína constitutiva, foi utilizado GAPDH. Para isso, as membranas foram submetidas a tratamento com solução Re-blot plus mild (Millipore, EUA) por 20 min, à temperatura ambiente, para a remoção dos anticorpos, e então incubadas de acordo com os procedimentos previamente descritos, utilizando-

se anticorpo primário anti-GAPDH (1:1000, policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000, cabra anti-coelho IgG HRP; Sigma, EUA).

3.1.5.7 Migração celular

Para avaliação da migração celular, CTMs e OBs foram cultivadas, separadamente, tanto em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) como em garrafas de 75 cm^2 (8×10^5 células/garrafa) por 10 dias. Neste período, CTMs e OBs crescidas em garrafas de 75 cm^2 foram tripsinizadas e plaqueadas, separadamente, em insertos com poros de $8 \mu\text{m}$ (10^5 células/inserto). Em seguida, os insertos contendo CTMs e OBs foram co-cultivados, respectivamente, com OBs e CTMs em placas de 24 poços. Como controle, foram utilizadas CTMs cultivadas em insertos isoladamente. Após 24 h de co-cultivo, as células remanescentes, localizadas na parte superior dos insertos, foram removidas com o auxílio de um swab. Posteriormente, as células aderidas à superfície inferior do inserto foram fixadas em metanol (Merck, Alemanha), por 2 min e à temperatura ambiente, e coradas com azul de toluidina a 1% por 2 min. A quantificação da migração celular foi obtida pela contagem das células que atravessaram os poros do inserto, em microscópio de luz Leica modelo DMLB (Leica, Alemanha), acoplado à câmera digital DFC310FX (Leica, Alemanha). Para cada inserto foram selecionados quatro campos aleatórios em objetiva de 20x para contagem do número total de células em cada campo. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Software, EUA). Os dados obtidos foram normalizados pelo número total de células que migraram no grupo CTMs controle e expressos em porcentagem de migração.

3.2 Ensaios *in vivo*

3.2.1 Seleção do arcabouço para carregamento das células

Para determinar qual o carreador mais adequado para as células, foram avaliadas as respostas do tecido ósseo a dois carreadores, a fibrina (Tissucol, Baxter, Brasil), conforme descrito por Wang et al. (2012) e a esponja de colágeno (Gelfoam, Pfizer, Brasil), conforme descrito por Rohanizadeh et al. (2008). Para tanto, foi utilizado o modelo de defeito com 5 mm de diâmetro em calvária de ratos (COOPER et al., 2010) preenchidos com fibrina, esponja de colágeno ou deixados sem nenhum preenchimento.

A fibrina foi preparada imediatamente antes da sua utilização, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as soluções de fibrinogênio e aprotinina foram aquecidas em banho-maria por 10 min à 37°C, após, a aprotinina foi misturada com fibrinogênio. Então, esta mistura foi mantida aquecida à 37°C por 1 min. Em outro frasco, a solução de trombina foi misturada com cloreto de cálcio (CaCl_2) e colocado em banho-maria com a mesma temperatura da primeira mistura até seu uso. As misturas de fibrinogênio com aprotinina e trombina com cloreto de cálcio foram acondicionadas em seringas separadas, ligadas por uma peça em Y, de modo que elas foram misturadas imediatamente antes da instalação no defeito ósseo para obtenção da fibrina.

Previamente à colocação das esponjas de colágeno nos defeitos ósseos, as mesmas foram manualmente cortadas com auxílio de pinça clínica e lâmina de bisturi nº 11 para obtenção de amostras com 2 a 3 mm de altura e 5 mm de diâmetro. Esse preparo da esponja de colágeno foi realizado em fluxo laminar para manter os carreadores estéreis.

3.2.1.1 Procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo

Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250 g foram submetidos à cirurgia para preparação de defeitos ósseos unilaterais em calvária com 5 mm de diâmetro. Para isso, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (7 mg/100 g peso corporal) (Agener União, Brasil) e Xilazina (0,6 mg/100 g peso corporal) (Calier, Brasil) administrados por via intramuscular. Após tricotomia e antissepsia com povidine-iodo alcoólica (PVPI, Cristalia, Brasil) na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados com lâmina de bisturi nº 15 ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O perióstio dos ossos parietais foi descolado e um defeito produzido unilateralmente utilizando uma broca tipo trefina com “stop” e 5 mm de diâmetro, sob irrigação abundante com soro fisiológico. Os defeitos ósseos foram preenchidos com esponja de colágeno, fibrina ou foram deixados sem preenchimento (Figura 1). Após, a pele foi suturada com nylon 3.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com solução de povidina-iodo alcoólica. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam dose única de analgésico Flunixinina meglumina (10 mg/100 g peso corporal) (Banamine, Schering-Plough, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil).

Figura 1. Colocação da esponja de colágeno na calvária de rato.

3.2.1.2 Eutanásia e coleta de material para análises

Ao final de 4 semanas, os animais foram mortos com inalação de dióxido de carbono e as calvárias contendo os defeitos foram removidas para posterior análises morfométrica por microtomografia computadorizada (micro-CT) e histológica em cortes descalcificados.

Após a eutanásia, as peças obtidas foram acondicionadas individualmente em potes plásticos identificados, contendo solução de formalina neutra tamponada 10%, pH = 7,0 à temperatura ambiente.

3.2.1.3 Microtomografia computadorizada

A análise tomográfica foi realizada por meio do 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 μm . Os dados foram adquiridos por um software de aquisição de imagens bidimensionais (2D) do próprio equipamento e as reconstruções tridimensionais (3D), necessárias para a análise morfométrica, foram feitas pelo software NRecon (SkyScan). Após as reconstruções, foram analisados, dentro da área de interesse (a região dos defeitos ósseos produzidos), os seguintes parâmetros: volume de tecido ósseo (mm^3), porcentagem de volume ósseo, área de tecido ósseo formado (mm^2), relação entre superfície de tecido ósseo formada e volume de tecido ósseo na área do defeito (mm^2/mm^3), espessura das trabéculas ósseas (mm), número de trabéculas ósseas ($1/\text{mm}$) e separação entre as trabéculas ósseas (mm). Estes parâmetros, são os preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR) e descritos por Parfitt et al. (1987).

3.1.2.4 Análise histológica

Após serem analisados pelo micro-CT, os espécimes foram descalcificados com solução de EDTA tamponada, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados e incluídos em parafina, seguindo protocolo de rotina. Os cortes obtidos, 6 μm de espessura, foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A análise histológica foi baseada em imagens representativas dos tratamentos avaliados, obtidas por microscopia de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha), captadas por câmera digital (Axiocam ICc3, Carl Zeiss, Alemanha) acoplada ao microscópio e processadas com o software Axion Vision (Axiocam ICc3, Carl Zeiss, Alemanha).

3.2.2 Efeito das células na reparação de defeitos ósseos

3.2.2.1 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais e osteoblastos derivados da medula óssea de ratos

A obtenção e cultura das CTMs e OBs foi realizada conforme descrito no item 3.1.1. Após a obtenção de suspensão de células, procedeu-se ao carreamento dessas células nos arcabouços de colágeno. A esponja de colágeno foi escolhida como carreador com base nos resultados obtidos nos experimentos descritos no item 3.2.1.

3.2.2.2 Carreamento das células por centrifugação

Para carrear as células na esponja de colágeno preparada como descrito no item 3.2.1, foi utilizado o método de centrifugação (YANG et al., 2001). Em tubos de centrífuga foram associados a esponja de colágeno e 5 mL do meio de cultura contendo CTMs, OBs ou a mistura de CTMs/OBs.

Devido às pequenas variações da esponja de colágeno pelo corte manual realizado com lâmina de bisturi, o número de células foi normalizado pelo peso da esponja de colágeno. Após a liberação enzimática das células conforme descrito anteriormente, procedeu-se à centrifugação das células em meio de crescimento associadas com a esponja de colágeno.

De acordo com estudo prévio de Beloti et al. (2009) que avaliou a quantidade de centrifugações necessárias para o carreamento de células em arcabouços, verificou-se que após a quarta centrifugação não há incorporação significativa de células aos carreadores. Portanto, nesse estudo foram realizadas 4 centrifugações a 2000 rpm por 1 min, sendo que as células foram gentilmente ressuspensas no meio de cultura entre cada centrifugação.

Ao final de cada ciclo de centrifugação, o número de células viáveis e não viáveis no meio de cultura foi detectado através do azul de tripan (Invitrogen, EUA) e as células contadas utilizando um contador automático (Countness cell counter, Invitrogen, EUA). Para isso, uma alíquota de 10 μ L da suspensão de células foi misturada com 10 μ L de azul de tripan a 0,4% e essa solução foi depositada em câmara adequada e submetida à análise pelo equipamento que determina o número de células viáveis (não marcadas pelo azul de tripan) e células não viáveis (marcadas pelo azul de tripan).

A densidade de células incorporadas à esponja de colágeno e a eficiência de carregamento (definida como o número de células carregadas/concentração inicial das células) foram determinadas pela diferença entre o número inicial e final de células no tubo de centrífuga ao final de cada centrifugação. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis

Para a comprovação do carregamento de células para o interior da esponja de colágeno, CTMs foram incubadas por 4 h com MTT (Sigma) que cora as células em azul e permite sua visualização microscópica. Em seguida, as células foram enzimaticamente liberadas e incorporadas à esponja de colágeno como descrito acima. A seguir, a esponja de colágeno contendo as células marcadas por MTT (Sigma) foi examinada em microscópio de luz óptica Leica DMLB (Leica) acoplado a uma câmera fotográfica digital Leica DC 300F (Leica). As imagens adquiridas foram processadas utilizando-se o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Software).

3.2.2.3 Colocação da esponja de colágeno com células em defeitos ósseos

Ratos Wistar pesando entre 200 e 250 g foram submetidos à cirurgia de calvária (conforme descrito no item 3.2.1.1) e os defeitos ósseos receberam esponjas

de colágeno carregadas com CTMS, OBs e CTMs/OBs na proporção 1:1 na concentração de 5×10^5 células. Defeitos que receberam esponjas de colágeno sem células foram utilizados como controle.

3.2.2.4 Eutanásia e coleta de material para análises

Ao final de 4 semanas, os animais foram mortos (conforme descrito no item 3.2.1.2) e as peças processadas como descrito acima nos itens 3.2.1.3 e 3.2.1.4.

3.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Alemanha). Os dados obtidos foram agrupados e tabulados para realizar a estatística descritiva (cálculos de média e desvio-padrão) para serem representados na forma de gráficos.

Para os experimentos *in vitro*, os ensaios de proliferação, atividade de ALP, formação de matriz mineralizada e migração celular foram realizados em quintuplicata ($n=5$) e a expressão gênica, em quadruplicata ($n=4$). Dados obtidos em diferentes períodos da cultura (proliferação, atividade de ALP e formação de matriz mineralizada) ou em um período com mais de dois grupos (migração celular e expressão gênica) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas e na presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Dados de ensaios realizados em um único período e com dois grupos (atividade de ALP, formação de matriz mineralizada e expressão gênica do modelo de meio condicionado) foram analisados pelo teste Mann-Whitney.

Para os experimentos *in vivo*, na comparação entre os grupos dos dados das análises tomográficas e do carregamento das células foi utilizado o teste de Kruskal-

Wallis para comparações múltiplas e na presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para todos experimentos, foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Co-culturas diretas

Figura 2. Proliferação das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 3, 7 e 10 dias. Legenda: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

A proliferação celular não foi diferente entre os grupos avaliados ($P=0,097$), porém aumentou ao longo do tempo de cultura ($P<0,001$), sendo $3 < 7 < 10$ dias ($P<0,05$). Apesar de algumas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos aos 3, 7 e 10 dias ($P<0,05$), essas diferenças não são consideradas biologicamente importantes (Figura 2).

Figura 3. Atividade de ALP das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 7, 10 e 14 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

A atividade de ALP foi diferente entre as culturas avaliadas ($P=0,016$) e aumentou ao longo do tempo de cultura ($P<0,001$), sendo $7 < 10 < 14$ dias ($P<0,05$). Aos 7 dias, as culturas de CTMs/OBs 2:1 apresentaram maior atividade de ALP comparadas às de CTMs/OBs 1:1 e CTMs ($P=0,016$). Aos 10 dias, as culturas de CTMs exibiram maior atividade de ALP, seguido das culturas de CTMs/OBs 2:1 ($P<0,05$). Aos 14 dias, as culturas de OBs apresentaram maior atividade de ALP, enquanto as culturas de CTMs apresentaram a menor atividade ($P<0,05$) (Figura 3). É interessante observar que a atividade de ALP apresentou um perfil diferente entre as culturas. Para aquelas de CTMs o pico de atividade foi aos 10 dias, enquanto aquelas que continham OBs, com exceção das CTMs/OBs 2:1, apresentaram atividade de ALP mais baixa e estável entre 7 e 10 dias, com aumento dessa atividade aos 14 dias.

Mineralização

Figura 4. Formação de matriz mineralizada das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 17 e 21 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada. B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

Ao final de 17 e 21 dias, nódulos de matriz mineralizada foram evidenciados pelo corante vermelho de Alizarina (Figura 4A) em todas as culturas, exceto naquelas de CTMs. Das culturas que apresentaram mineralização, as de OBs produziram matriz mais densamente marcada e que se apresentava distribuída de maneira uniforme. A quantificação (Figura 4B) mostrou que a formação de matriz mineralizada foi diferente

entre as culturas avaliadas ($P < 0,001$) e aumentou de 17 para 21 dias de cultura ($P < 0,001$). Em ambos os períodos, OBs apresentaram maior formação de matriz mineralizada, seguido de CTMs/OBs 1:1 ($P < 0,05$).

Figura 5. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs em diferentes proporções aos 10 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

Para facilitar o entendimento, os resultados das análises estatísticas da avaliação da expressão gênica estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises estatísticas da expressão dos genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs. São mostrados os genes avaliados, a significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre culturas mostradas pelo teste de Mann-Whitney.

Gene	Diferenças entre culturas	Kruskal-Wallis (Valor de P)
ALP	OBs>CTMs/OBs1:2>CTMs/OBs1:1=CTMs/OBs1:2>CTMs	0,001
BSP	OBs=CTMs/OBs1:2>CTMs/OBs1:1>CTMs/OBs2:1>CTMs	0,001
OC	OBs>CTMs/OBs1:2>CTMs/OBs1:1=CTMs/OBs1:2>CTMs	0,001
OPN	CTMs/OBs1:2>OBs>CTMs CTMs/OBs1:2=CTMs/OBs1:1>CTMs/OBs2:1>CTMs	0,001
OSX	OB=CTMs/OBs1:2>CTMs/OBs1:1=CTMs/OBs2:1>CTMs	0,002
RUNX2	OBs>CTMs/OBs1:2>CTMs/OBs1:1=CTMs/OBs2:1>CTMs	0,001

Dos 6 genes analisados, para 5 deles (ALP, BSP, OC, OSX e RUNX2), OBs apresentaram maior expressão seguidos de CTMs/OBs 1:2 que apresentaram expressão similar aos OBs para os genes OSX e BSP ($P<0,05$). Para o gene OPN a expressão foi maior em CTMs/OBs 1:2 ($P<0,05$). Os grupos com menor proporção de OBs apresentaram menor expressão ($P<0,05$). Como esperado, CTMs apresentaram a menor expressão para todos os genes analisados ($P<0,05$) (Figura 5, Tabela 1).

Figura 6. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs/OBs 1:1; D) CTMs/OBs 1:2; E) CTMs/OBs 2:1.

A marcação para BSP nas culturas era, predominantemente, citoplasmática, em região perinuclear (Figura 6B-E), e mais evidente no grupo OBs, seguido dos

grupos de associação de células. No grupo CTMs notou-se ausência de marcação (Figura 6A).

Figura 7. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência verde indica imunolocalização de OPN. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em fluorescência azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs/OBs 1:1; D) CTMs/OBs 1:2; E) CTMs/OBs 2:1.

A marcação para OPN era predominantemente citoplasmática (Figura 7B-E), e mais evidente nas culturas de associação de CTMs/OBs 2:1, seguida de CTMs/OBs 1:1 e OBs. Nas culturas de CTMs notou-se ausência de marcação (Figura 7A).

Figura 8. Expressão da proteína RUNX2 das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 aos 10 dias. Legendas: CTMs/OBs 1:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:1; CTMs/OBs 1:2 = associação de CTMs e OBs na proporção de 1:2; CTMs/OBs 2:1 = associação de CTMs e OBs na proporção de 2:1.

Aos 10 dias, a análise por Western blot revelou maior expressão relativa da proteína RUNX2 para as culturas de OBs e CTMs/OBs 2:1, seguidas das culturas de CTMs, CTMs/OBs 1:1 e CTMs/OBs 1:2 (Figura 8).

4.1.2 Co-culturas indiretas

Figura 9. Proliferação das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 3, 7 e 10 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4).

A proliferação celular não foi diferente entre as culturas avaliadas ($P=0,126$), porém aumentou ao longo do tempo de cultura ($P<0,001$), sendo $3 < 7 < 10$ dias ($P<0,001$). Apesar de algumas diferenças estatisticamente significantes entre as culturas aos 3, 7 e 10 dias ($P<0,05$), essas diferenças não foram consideradas biologicamente importantes (Figura 9).

Figura 10. Atividade de ALP das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 10 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

Ao final de 10 dias, a atividade de ALP foi diferente entre as culturas avaliadas ($P=0,005$). As culturas de OBs apresentaram a maior atividade de ALP, enquanto as culturas de OBs em co-cultura indireta com CTMs apresentaram redução dessa atividade. As CTMs sob influência das OBs apresentaram menos atividade do que as CTMs cultivadas sozinhas ($P=0,029$) (Figura 10).

Mineralização

Figura 11. Formação de matriz mineralizada das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 17 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivadas com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada. B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).

Ao final de 17 dias, todas as culturas apresentaram formação de matriz mineralizada como detectada pelo corante vermelho de Alizarina, exceto as culturas de CTMs (Figura 11A). As culturas de OBs apresentaram maior formação de matriz mineralizada, que estava reduzida em OBs em co-cultura indireta com CTMs, foi ainda menor em CTMs co-cultivadas com OBs e quase não detectada em culturas de CTMs ($P=0,003$). Esses dados são mostrados na Figura 11B.

Figura 12. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:2 com insertos aos 10 dias. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivadas com CTMs; OBs→CTMs = CTMs co-cultivadas com OBs. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).

Para facilitar o entendimento, os resultados das análises estatísticas da avaliação da expressão gênica estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das análises estatísticas da expressão dos genes marcadores osteoblásticos em CTMs, OBs e associação de CTMs e OBs. São mostrados os genes avaliados, a significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e as diferenças entre culturas mostradas pelo teste de Mann-Whitney.

Gene	Diferenças entre culturas	Kruskal-Wallis (Valor de P)
ALP	OBs>CTMs→OBs=OBs→CTMs<CTMs	0,010
	CTMs=OBs→CTMs	
BSP	OBs>OBs→CTMs>CTMs→OBs<CTMs	0,003
OC	OBs>CTMs→OBs=OBs→CTMs>CTMs	0,004
OPN	OBs=OBs→CTMs>CTMs→OBs<CTMs	0,004
OSX	OBs=OBs→CTMs>CTMs=CTMs→OBs	0,006
RUNX2	OBs=CTMs>OBs→CTMs=CTMs→OBs	0,007

As culturas de OBs apresentaram maior expressão para todos os genes avaliados. As de OBs em co-cultura com CTMs apresentaram expressão similar aos OBs para os genes OPN e OSX, mas menores para todos os outros genes. A comparação dos OBs co-cultivados com CTMs com as CTMs co-cultivadas com OBs mostrou que a expressão dos genes BSP, OPN e OSX foi maior. Para as culturas de CTMs todos os genes estavam menos expressos, exceto RUNX2 (Figura 12, Tabela 2).

Figura 13. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs→OBs = OBs co-cultivados com CTMs. A) CTMs; B) OBs; C) CTMs→OBs.

A marcação para BSP nas culturas era, predominantemente, citoplasmática, em região perinuclear (Figura 13B, C), e mais evidente no grupo OBs, seguido dos OBs co-cultivados com CTMs. No grupo CTMs notou-se ausência de marcação (Figura 13A).

Figura 14. Porcentagem de células que migraram através dos insertos em CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1 com insertos aos 10 dias. Legendas: CTMs = Migração de CTMs para poço sem células; OBs = migração de OBs para poço sem células; $\frac{OBs}{CTMs}$ = migração de OBs em direção a CTMs no poço; $\frac{CTMs}{OBs}$ = migração de CTMs em direção a OBs no poço. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Figura 15. Micrografia da migração das CTMs e OBs cultivadas isoladamente e associadas na proporção de 1:1 com insertos aos 10 dias. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: CTMs = Migração de CTMs para poço sem células; OBs = migração de OBs para poço sem células; $\frac{OBs}{CTMs}$ = migração de OBs em direção a CTMs no poço; $\frac{CTMs}{OBs}$ = migração de CTMs em direção a OBs no poço. A) CTMs; B) OBs; C) $\frac{OBs}{CTMs}$; D) $\frac{CTMs}{OBs}$.

A migração celular de CTMs e OBs foi avaliada aos 10 dias de cultura. A migração celular foi diferente entre os grupos avaliados ($P=0,002$), verificando-se que maior quantidade de CTMs migrou em direção aos OBs, seguido de OBs em direção a CTMs ($P=0,029$). Como esperado, quase não houve migração das CTMs e OBs cultivadas isoladamente ($P=0,029$) (Figuras 14 e 15A-D).

4.1.3 Culturas com meio condicionado

Figura 16. Proliferação de OBs cultivados por 3, 7 e 10 dias. Legenda: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

A proliferação foi diferente entre as culturas avaliadas ($P<0,001$) e aumentou ao longo do tempo de cultura ($P<0,001$), sendo $3 < 7 < 10$ dias ($P<0,001$). De maneira geral, a adição de meio condicionado por CTMs reduziu a proliferação das culturas de OBs (Figura 16).

Figura 17. Atividade de ALP de OBs de OBs cultivados por 7, 10 e 14 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

A atividade de ALP não foi diferente entre as culturas avaliadas ($P < 0,071$), porém aumentou ao longo do tempo de cultura ($P < 0,001$), sendo $7 < 10 = 14$ dias ($P < 0,001$). As culturas de OBs com adição de meio condicionado por CTMs apresentaram menor atividade de ALP aos 10 e 14 dias ($P < 0,05$) (Figura 17).

Mineralização

Figura 18. Formação de matriz mineralizada de OBs cultivados por 17 e 21 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. A) Imagens dos poços de cultura mostrando formação de matriz mineralizada. B) Quantificação da matriz mineralizada. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

Ao final de 17 e 21 dias, nódulos de matriz mineralizada foram evidenciados em todas as culturas pelo corante vermelho de Alizarina (Figura 18A). A quantificação mostrou que a formação de matriz mineralizada foi diferente entre as culturas

($P=0,006$) e aumentou ao longo do período de cultura ($P=0,006$). Em ambos os períodos, as culturas de OBs com adição de meio condicionado por CTMs apresentaram menor formação de matriz mineralizada ($P=0,008$) (Figura 18B).

Figura 19. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos em OBs cultivados por 10 dias. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. A) ALP; B) BSP; C) OC; D) OPN; E) OSX; F) RUNX2. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

A expressão gênica relativa foi diferente entre as culturas para todos os genes avaliados ($P=0,029$). Dos 6 genes analisados, para 5 deles (ALP, BSP, OC, OSX e

RUNX2), as culturas de OBs com adição de meio condicionado por CTMs apresentaram menor expressão e apenas a expressão do gene OPN estava aumentada ($P=0,029$) (Figura 19).

Figura 20. Epifluorescência aos 10 dias de culturas de células crescidas sobre Thermanox. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de BSP. Citoesqueleto de actina marcado em cinza e núcleos celulares em azul. Barra de escala = 100 μ m. Legendas: OBs (MC) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento na proporção 1:1; OBs (MCo) = osteoblastos cultivados em meio osteogênico misturado com meio condicionado por CTMs na proporção 1:1. A) OBs (MC); B) OBs (MCo).

A marcação para BSP nas culturas era, predominantemente, citoplasmática, em região perinuclear (Figura 20A, B), e mais evidente no grupo dos OBs cultivados em meio osteogênico misturado com meio de crescimento (Figura 20A).

4.2 Ensaios *in vivo*

4.2.1 Seleção do arcabouço para carregamento das células

As reconstruções microtomográficas 3Ds mostraram a persistência dos defeitos em 4 semanas para todos os grupos, contudo, observa-se que em poucas áreas ocorreu a formação de tecido ósseo mineralizado (Figura 21A-C).

Figura 21. Imagens microtomográficas (A-C) e fotomicrografias (D-F) de defeitos ósseos, criados em calvárias de ratos, não-preenchidos (A, D) ou preenchidos com esponja de colágeno (B, E) ou com fibrina (C, F), 4 semanas pós-implantação. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A-C = 2,5 mm; D-F = 800 μ m. CONT: controle; COL: esponja de colágeno; FIBR: fibrina. A) CONT; B) COL; C) FIBR; D) CONT; E) COL; F) FIBR.

A análise histológica mostrou a presença de vasos neoformados, algumas áreas de neoformação óssea e tecido conjuntivo denso em todos os grupos. Como esperado, tecido conjuntivo denso foi observado dentro dos defeitos vazios e neoformação óssea apenas na periferia do defeito, com pequenas e poucas áreas de tecido ósseo no meio do tecido conjuntivo denso que preenchia o defeito (Figura 21D-F). Em geral, o aspecto histológico dos tecidos formados não apresentou diferença entre os carreadores avaliados.

Figura 22. Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas de nova formação óssea em defeitos de calvária de ratos não-preenchidos e preenchidos com esponja de colágeno ou fibrina em 4 semanas. A) Volume ósseo; B) Porcentagem de volume ósseo; C) Superfície óssea; D) Proporção superfície/volume ósseo; E) Espessura trabecular; F) Número de trabéculas; G) Separação trabecular. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Notamos que houve maior formação de tecido ósseo nos animais tratados com fibrina, seguido por esponja de colágeno e, por último, os defeitos sem preenchimento. Dentre os parâmetros avaliados na análise microtomográfica, apenas a superfície de tecido ósseo formado apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P = 0,026$). A superfície de tecido ósseo foi maior nos defeitos preenchidos com fibrina em comparação àqueles preenchidos com esponja de colágeno ($P=0,008$). Porém, não houve diferença entre os defeitos não

preenchidos e àqueles preenchidos por fibrina ($P=0,06$) ou esponja de colágeno ($p=1,0$) (Figura 22A-G).

Com base nesses resultados e na maior facilidade de utilização, a esponja de colágeno foi o carreador escolhido para avaliar o efeito das células na reparação dos defeitos ósseos.

4.2.2 Carreamento das células

Figura 23. A) Células carregadas na esponja de colágeno. O número de células carregadas aumentou gradualmente com a progressão dos ciclos de centrifugação. Dados são expressos como número de células e reportados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$); B) Viabilidade celular relacionada ao número dos ciclos de centrifugação e ressuspensão. Dados são expressos como porcentagem de células viáveis e reportadas como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). C) Células coradas com MTT são verificadas nas paredes internas da esponja de colágeno cortada transversalmente. CTMs: células-tronco mesenquimais; OBs: osteoblastos; CTMs/OBs: associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos.

O número de células carregadas para as esponjas de colágeno aumentou ao longo dos ciclos de centrifugação (Figura 23A). Considerando-se a concentração inicial de células (5×10^5) colocado no tubo da centrífuga e o número de células carregado ao final de 4 ciclos (aproximadamente $3,6 \times 10^5$), a eficiência foi de aproximadamente 72% e não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao tipo de células carregadas ($p=0,957$). Além disso, ao longo dos ciclos de centrifugação a viabilidade permaneceu próxima de 100% (Figura 23B) e, novamente, sem diferenças estatísticas entre os tipos celulares ($p=0,433$). Na figura 23C, que mostra uma esponja de colágeno em corte transversal, observa-se que esse método foi eficiente para carrear células para todas as paredes das esponjas de colágeno.

4.2.3 Efeitos das células na reparação de defeitos ósseos

Notamos que houve maior formação de tecido ósseo nos animais tratados com OBs, seguido por CTMs e, por último, CTMs/OBs (Figura 24A-D). O defeito permaneceu praticamente sem formação de tecido ósseo nos controles (esponja de colágeno).

Figura 24. Imagens microtomográficas (A-D) e fotomicrografias (E-L) de defeitos ósseos, criados em calvárias de ratos, preenchidos com esponjas de colágeno não-associadas (A, E, I) ou associadas a CTMs (B, F, J), OBs (C, G, K) ou CTMs/OBs (D, H, L), 4 semanas pós-implantação. Os defeitos ósseos tratados com esponjas de colágeno não carregadas com células foram preenchidos por tecido conjuntivo e uma discreta formação óssea ocorreu nas bordas dos defeitos (E). Uma maior formação óssea foi observada nos defeitos ósseos tratados com esponjas de colágeno associadas a células (F-H). As cabeças de seta indicam linha cimentante entre osso lamelar e osso imaturo (I), remanescente da esponja de colágeno (J) e camada de osteoblastos revestindo a matriz extracelular em processo de mineralização (K). Os asteriscos indicam vasos sanguíneos (K, L). Os detalhes histológicos descritos estavam presentes em todos os defeitos ósseos independentemente do tipo de tratamento a que foram submetidos. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A-D = 2,5 mm; E-H = 800 µm; I-L = 100 µm. COL: esponja de colágeno; COL+CTMs: esponja de colágeno carregada com células-tronco mesenquimais; COL+OBs: esponja de colágeno carregada com osteoblastos; COL+CTMs/OBs: esponja de colágeno carregada com associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos; ol: osso lamelar; oi: osso imaturo. A) COL; B) COL+CTMs; C) COL+OBs; D) COL+CTMs/OBs; E) COL; F) COL+CTMs; G) COL+OBs; H) COL+CTMs/OBs; I) COL; J) COL+CTMs; K) COL+OBs; L) COL+CTMs/OBs.

A análise histológica mostrou ausência de formação óssea nos defeitos tratados apenas com esponja de colágeno e formação óssea heterogênea nos defeitos dos grupos tratados com células. Vasos neoformados, neoformação óssea e tecido conjuntivo denso foram observados em todos os grupos, sem diferenças histológicas significativas entre os grupos com ou sem injeção das células (Figura 24E-H). Como esperado, apenas tecido conjuntivo denso foi observado dentro dos defeitos tratados com esponja de colágeno (Figura 24E). Em todos os grupos,

observou-se tecido ósseo neoformado na periferia do defeito exibindo lacunas de osteócitos (Figura 24I), com algumas áreas apresentando tecido ósseo neoformado coberto por osso lamelar e separados por linha cimentante (Figura 24I). Nos animais tratados com células verificamos grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados e deposição de osteóide, osteoblastos enfileirados revestindo a matriz óssea extracelular em processo de mineralização (Figura 24K, L) e ilhas de tecido ósseo no meio do tecido conjuntivo denso que preenchia o defeito (Figura 24L). Além disso, apenas nos animais tratados com células, observamos a presença de esponja de colágeno remanescente (três de cada cinco espécimes avaliados) (Figura 24J), sendo caracterizado como uma reabsorção heterogênea da esponja de colágeno. Em nenhum dos grupos, com ou sem células, observamos reação de corpo estranho, inflamação crônica, ou infecção.

Figura 25. Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas de nova formação óssea em defeitos de calvária de ratos preenchidos com esponja de colágeno ou esponja de colágeno carregada com células em 4 semanas CTMs: células-tronco mesenquimais; OBs: osteoblastos; CTMs/OBs: associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos. A) Volume ósseo; B) Porcentagem de volume ósseo; C) Superfície óssea; D) Proporção superfície/volume ósseo; E) Espessura trabecular; F) Número de trabéculas; G) Separação trabecular. Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).

Dentre os parâmetros avaliados na análise microtomográfica (Figura 25A-G), apenas o volume de tecido ósseo apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,045$) (Figura 25A). O volume de tecido ósseo foi maior nos defeitos preenchidos com OBs em comparação àqueles preenchidos com esponja de colágeno ($P=0,032$) e CTMs ($P=0,05$), porém, não houve diferença com àqueles preenchidos por CTMs/OBs ($P=0,310$).

Portanto, a análise histológica confirmou as observações notadas no micro-CT, sendo que praticamente nenhum dos parâmetros mensurados *in vivo* demonstrou claro padrão de diferença entre o uso das células indiferenciadas (CTMs), diferenciadas OBs) ou a associação de ambas (CTMs/OBs).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para avaliar se a combinação de CTMs e OBs seria de maior eficácia na regeneração de defeitos ósseos do que qualquer uma dessas células separadamente. Para verificar os efeitos de CTMs sobre OBs, em um ambiente mais controlado experimentalmente, utilizamos diferentes modelos de co-cultura de células e para avaliar os efeitos dessas células, sozinhas ou combinadas, sobre a regeneração óssea, utilizamos estratégias de engenharia de tecido carregando as células para defeitos criados em calvária de ratos.

Nos experimentos de cultura de células, foram utilizados três modelos de cultivo. Para mimetizar a interação célula-célula, foi utilizado um modelo de co-cultura direta em que CTMs e OBs foram cultivados juntos em diferentes proporções. Para mimetizar os efeitos parácrinos, foram utilizados dois modelos: um de co-cultura indireta, em que as células foram cultivadas sob as mesmas condições, mas separadas por um filtro que impedia a migração celular e outro no qual OBs foram cultivados em meio condicionado por CTMs. Nossos resultados mostraram que, independentemente do modelo de co-cultura, as CTMs têm efeito repressivo sobre a proliferação e as expressões fenotípicas e genotípicas de OBs. Adicionalmente, esses resultados mostraram existir efeito quimiotático recíproco entre CTMs e OBs na migração celular, que é mais acentuado quando OBs induzem a migração de CTMs.

Nos experimentos para avaliar a regeneração óssea, considerando a necessidade de um biomaterial que pudesse carrear as células para os defeitos ósseos e permanecesse nesses defeitos, primeiramente, avaliou-se o efeito de dois carreadores, esponja de colágeno e fibrina, sobre a formação óssea. Como nenhum dos carreadores avaliados promoveu reparação dos defeitos, a escolha da esponja

de colágeno foi realizada com base no seu menor custo, facilidade de manipulação e carreamento das células. Ao comparar os efeitos das células (CTMs, OBs e associação CTMs/OBs) no reparo dos defeitos ósseos observaram-se diferenças, principalmente qualitativas, na formação óssea entre os diferentes tipos celulares utilizados, com tendência a maior formação óssea em defeitos tratados com OBs.

É bem conhecido que diversas células diferenciadas como adipócitos, condrócitos, osteócitos e osteoblastos influenciam as CTMs (GERSTENFELD et al., 2002; HEINO et al., 2004; BIRMINGHAM et al., 2012; SADIE-VAN GIJSEN et al., 2013). Em especial, a diferenciação osteoblástica das CTMs por influência de outras células tem sido bastante estudada (HEINO et al., 2004; CSAKI et al., 2009; ILMER et al., 2009; LIAO et al., 2011; BIRMINGHAM et al., 2012). Por outro lado, a influência das CTMs sobre os OBs foi analisada anteriormente por dois grupos de pesquisa (KIM et al., 2003; SUN et al., 2012), mas de forma limitada apenas a modelo de co-cultura direta (KIM et al., 2003) ou pelo uso de meio condicionado (SUN et al., 2012). Outra limitação do estudo de Kim et al. (2003) é que eles utilizaram mistura de células de animais diferentes (ratos e coelhos).

No presente estudo, dos três modelos de cultura utilizados, observamos que apenas o uso de meio condicionado por CTMs inibiu a proliferação de OBs. Este efeito não foi observado com a co-cultura direta porque nesses experimentos não foi realizada a avaliação dos OBs sozinhos, mas sim a avaliação das culturas como um todo, CTMs e OBs. No caso das co-culturas indiretas, pode ter ocorrido a liberação de fatores em quantidades muito pequenas para produzir o efeito inibitório sobre os OBs porque foi utilizada menor proporção de CTMs (1:2) em comparação com a quantidade de meio condicionado (1:1). Esses resultados estão de acordo com aqueles de Sun et al. (2012) que também mostraram redução na proliferação de OBs

induzidas por CTMs, com efeito mais acentuado quando o meio condicionado foi empregado na proporção 1:1. Outros estudos também relataram efeito inibitório de CTMs sobre células do sistema imune, hepáticas e derivadas de câncer de próstata (SPAGGIARI et al., 2009; QIN et al., 2012; CUERQUIS et al., 2014; TAKAHARA et al., 2014).

O efeito inibitório das CTMs sobre as expressões fenotípicas e genotípicas dos OBs indicam inibição do processo de diferenciação osteoblástica. Isso é evidenciado pela redução na atividade de ALP e na sua expressão gênica, marcador inicial dessa diferenciação, bem como, na redução da expressão gênica de BSP e OC, expressão protéica de BSP e na formação de matriz mineralizada, essa última sendo a etapa final da osteogênese. A inibição da diferenciação osteoblástica, provavelmente, se deu como consequência da inibição da expressão dos fatores de transcrição RUNX2 e os OSX. Vários estudos têm mostrado que a expressão desses fatores é essencial para que ocorra a formação de osteoblastos e a consequente formação de tecido ósseo (KOMORI et al., 1997; DUCY et al., 1999; NAKASHIMA et al., 2002; TAI et al., 2004). Tanto que, em animais geneticamente modificados para não expressar esses fatores de transcrição, não há formação óssea ou a mesma ocorre de forma incompleta (KOMORI et al., 1997; NAKASHIMA et al., 2002).

Contrariamente ao observado por Sun et al. (2012), esse efeito inibitório não foi transitório porque o estágio final da diferenciação osteoblástica, que é a formação de matriz mineralizada, também foi inibido pelas co-culturas ou meio condicionado de CTMs. Uma provável explicação para essa diferença talvez esteja nos modelos de cultura de OBs utilizados nesse e naquele estudo. Nós utilizamos OBs em estágio mais inicial de diferenciação do que Sun et al. (2012) sobre os quais os efeitos inibitórios de CTMs seriam permanentes. Por outro lado, Sun et al. (2012) utilizaram

culturas de OBs derivadas de calvárias de ratos, que apresentam células em diferentes estágios de diferenciação osteoblástica, sendo possível que aquelas em estágios iniciais, que expressam RUNX2 mas não OSX, tenham sido afetadas. Com o avanço das culturas e considerando o efeito inibitório das CTMs sobre OBs em fase inicial, aquelas em fase mais tardia da diferenciação talvez tenham se constituído na população dominante, o que resultaria em aparente recuperação das culturas. Em favor dessa explicação há o fato de que aqueles autores observaram redução na expressão de RUNX2 mas não de OSX, sendo conhecido que OSX é expresso em células que já expressam RUNX2 (NAKASHIMA et al., 2002).

Nossos experimentos mostraram que tanto CTMs como OBs liberam fatores quimiotáticos capazes de induzir a migração celular. Dentre os vários candidatos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento beta 1 ($TGF-\beta 1$), proteínas morfogenéticas ósseas tipos 2 e 4 (BMP), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) causam quimiotaxia de CTMs e OBs (LIND et al., 1995; FIEDLER et al., 2002; MAYR-WOHLFART et al., 2002; OZAKI et al., 2007), sendo que a combinação deles e a concentração disponível são importantes para provocar o efeito máximo de quimiotaxia (FIEDLER et al., 2002; OZAKI et al., 2007). Como observamos que houve maior migração das CTMs em direção aos OBs, talvez haja maior liberação de fatores quimiotáticos de OBs para recrutamento das CTMs do que o contrário.

Previamente aos experimentos de engenharia de tecidos, foram avaliados dois potenciais carreadores para as células, a fibrina e a esponja de colágeno. Esses biomateriais são utilizados clinicamente como agentes hemostáticos, durante e após procedimentos cirúrgicos (ROHANIZADEH et al., 2008; KIM et al., 2013), no entanto, experimentalmente ambos têm sido utilizados para o preenchimento de defeitos

ósseos ou para carrear células visando a reparação óssea (PONTICIELLO et al., 2000; ROHANIZADEH et al., 2008; LEE et al., 2011; STOCKMANN et al., 2012; KIM et al., 2013; MROZIK et al., 2013; SUN et al., 2013). No presente estudo, foi observado que estes biomateriais, isoladamente, não promoveram reparo ósseo dos defeitos de calvária. Este resultado difere daqueles obtidos por Fin et al. (1992) e Sohn et al. (2010), que relataram que a esponja de colágeno promoveu o reparo em defeitos ósseos em crista ilíaca e seio maxilar, respectivamente. Essa discordância pode ser explicada pelos modelos de defeitos ósseos utilizados no nosso estudo e naqueles outros. Enquanto defeitos com 5 mm em calvária de ratos não reparam no período de até 8 semanas (SICCHIERI et al., 2012), defeitos em crista ilíaca reparam sem qualquer tratamento (GIL-ALBAROVA e GIL-ALBAROVA, 2012) e ocorre formação de tecido ósseo em seio maxilar como resultado apenas do levantamento da sua membrana (LUNDGREN et al., 2004). Além disso, corroborando nossos resultados, outros estudos também mostraram que ambos os biomateriais não promoveram reparo ósseo (KARP et al., 2004; LEE et al., 2011; STOCKMANN et al., 2012; SUN et al., 2013). Considerando que nenhum dos biomateriais foi capaz de reparar os defeitos em calvárias de ratos, para estudar os efeitos dos diferentes tipos celulares, nós optamos pela esponja de colágeno baseado na sua facilidade de carrear células e de manuseio clínico durante os procedimentos de implantação nos defeitos, associado ao menor custo.

Diferentes métodos foram descritos na literatura para carrear células: dinâmico, estático, perfusão por biorreator, centrifugação, injeção da suspensão de células diretamente na superfície do carreador e cultura das células com o carreador (BURG et al., 2000; PONTICIELLO et al., 2000; TROUM e DALTON, 2001; YANG et al., 2001; ROHANIZADEH et al., 2008; BELOTI et al., 2009; BABA et al., 2010;

MROZIK et al., 2013; SUN et al., 2013). Para carrear as células na esponja de colágeno, foi utilizado o método de centrifugação, baseado no trabalho de Beloti et al. (2009), que verificaram que este método permite um carregamento eficiente e distribuição homogênea das células em um carreador polimérico, sem prejudicar a viabilidade celular. De fato, no presente estudo, foi confirmado que em torno de 72% das células, independente do tipo celular, foram carregadas e mantiveram a viabilidade próxima de 100%, bem como estavam homogeneamente distribuídas em toda a esponja de colágeno. Além disso, as esponjas de colágeno mantiveram sua estrutura tridimensional mesmo após seguidos ciclos de centrifugação. Tais achados evidenciam que o método de ciclos de centrifugação é bastante adequado ao carregamento de células mesmo utilizando diferentes carreadores.

A avaliação do reparo dos defeitos revelou, após 4 semanas, a ausência completa da esponja de colágeno quando não havia o carregamento de células, enquanto que nos animais tratados com esponja de colágeno carregada com células, observou-se a permanência da esponja de colágeno em 3 dos 5 animais de cada grupo. Isso ocorreu pela presença de células e foi independente do tipo de célula carregada. Tal observação é de difícil explicação, mas se pode especular que, nos casos em que a esponja de colágeno permaneceu por mais tempo, o fato de uma maior área de superfície da esponja estar revestida por células, tenha feito com que as mesmas atuassem como uma proteção aos mecanismos de degradação que levam ao desaparecimento do biomaterial. Essa imprevisibilidade da degradação, com permanência da esponja de colágeno em alguns defeitos e não em outros, também foi descrita por outros pesquisadores (PONTICIELLO et al., 2000; TROUM e DALTON, 2001; ROHANIZADEH et al., 2008; LEE et al., 2011; MROZIK et al., 2013; SUN et al., 2013), sendo esta uma limitação do uso desse biomaterial como carreador de células.

Para Sun et al. (2013), a biodegradação da esponja de colágeno sem causar inflamação local expressiva é evidenciada pela ausência desse biomaterial após 6-7 semanas de sua implantação no defeito ósseo. Isso explicaria, pelo menos em parte, os achados do presente estudo, uma vez que o período de avaliação, de 4 semanas, não seria suficiente para a completa degradação da esponja de colágeno.

No presente estudo utilizamos CTMs, OBs em fase inicial de diferenciação e associação dessas células (CTMs/OBs). Optamos por usar OBs em estágio inicial de diferenciação porque essas células têm resultado em maior reparação óssea em comparação com OBs mais diferenciados quando essas células são transplantadas para defeitos ósseos *in vivo* (BELOTI et al., 2012). Quanto ao reparo dos defeitos ósseos, nossos resultados baseados nas reconstruções 3D das análises microtomográficas mostraram que houve maior formação óssea nos defeitos tratados com células. A análise histológica não evidenciou diferenças importantes nos tecidos que preenchiam os defeitos, sendo encontrado em todos eles a predominância de tecido conjuntivo com muitos vasos sanguíneos e áreas de tecido ósseo neoformado. Dentre todos os parâmetros utilizados na análise morfométrica, apenas no volume de tecido ósseo foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, mostrando que o uso de OBs foi superior ao uso de CTMs e da esponja de colágeno e igual à combinação de CTMs/OBs. A porcentagem de volume ósseo apresentou uma tendência a ser maior nos defeitos tratados com OBs e CTMs/OBs, mas sem diferença estatística. De maneira geral, parece que o uso de OBs apresenta uma discreta vantagem, principalmente, em relação ao uso de CTMs. Sustentando essa evidência, existe o relato de outros grupos mostrando maior formação óssea induzida por OBs (SCHANTZ et al., 2012). Ao menos em parte, é possível que isso se deva ao fato de que os OBs permanecem mais tempo nos defeitos ósseos do que as CTMs

(TORTELLI et al., 2010). Outra vantagem no uso de OBs seria a maior capacidade dessas células de atraírem CTMs para os defeitos, conforme mostrado nos experimentos de migração celular, as quais poderiam contribuir para outros fenômenos importantes na regeneração óssea, tal como para a vasculogênese (TANG et al., 2004). No entanto, contrária à nossa hipótese, a associação de CTMs/OBs não apresentou nenhuma vantagem sobre qualquer dos tipos celulares isoladamente.

Como observado pelas análises utilizadas nesse estudo, houve pouca formação óssea nos defeitos tratados com células. Em nosso estudo anterior, mesmo realizando as avaliações em período inicial da reparação óssea, 4 semanas, observamos maior formação óssea induzida por CTMs e OBs em estágio inicial de diferenciação (BELOTI et al., 2012). Além das diferenças nos métodos de avaliação morfológica entre os estudos, deve-se considerar que no estudo anterior foi utilizado um carreador que por si só era capaz de promover a formação óssea (SICCHIERI et al., 2012), o que não ocorreu com a esponja de colágeno. Apesar disso, é possível que se essas avaliações tivessem sido realizadas em períodos mais tardios, talvez uma maior formação óssea pudesse ter sido observada. Em favor dessa hipótese, existem estudos mostrando aumento da formação óssea ao longo do período de implantação (SICCHIERI et al., 2012; STOCKMANN et al., 2012) e as evidências histológicas desse estudo que mostraram tecido ósseo em formação nos defeitos tratados com células. Adicionalmente, nesses defeitos foi observada grande quantidade de vasos sanguíneos, o que tem sido considerado essencial para ocorrer a formação óssea (GERBER e FERRARA, 2000; PELISSIER et al., 2003).

Contrário à nossa hipótese inicial, foi observado *in vitro* que a associação de CTMs e OBs tem impacto negativo na osteogênese e corroborando essa observação,

demonstrou-se *in vivo* que a combinação de CTMs e OBs não resultou em aumento na regeneração óssea, mas que os OBs sozinhos parecem mostrar maior potencial para reparar defeitos ósseos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as CTMs apresentam efeito inibitório sobre as expressões fenotípicas e genotípicas de OBs e que a terapia celular com OBs parece ser mais eficaz no reparo do tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

ANJOS-AFONSO, F.; SIAPATI, E. K.; BONNET, D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 23, p. 5655-5664, 2004.

AUNG, A.; GUPTA, G.; MAJID, G.; VARGHESE, S. Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 1, p. 148-158, 2011.

BABA, S.; INOUE, T.; HASHIMOTO, Y.; KIMURA, D.; UEDA, M.; SAKAI, K.; MATSUMOTO, N.; HIWA, C.; ADACHI, T.; HOJO, M. Effectiveness of scaffolds with pre-seeded mesenchymal stem cells in bone regeneration--assessment of osteogenic ability of scaffolds implanted under the periosteum of the cranial bone of rats. **Dent Mater J**, v. 29, n. 6, p. 673-681, 2010.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp Hematol**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.

BELOTI, M. M.; SICCHIERI, L. G.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L. 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**, v. 18, n. 9-10, p. 999-1005, 2012.

BELOTI, M. M.; TAMBASCO DE OLIVEIRA, P.; PERRI DE CARVALHO, P. S.; ROSA, A. L. Seeding osteoblastic cells into a macroporous biodegradable CaP/PLGA scaffold by a centrifugal force. **J Biomater Appl**, v. 23, n. 6, p. 481-495, 2009.

BI, Y.; EHIRCHIOU, D.; KILTS, T. M.; INKSON, C. A.; EMBREE, M. C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET, A. I.; SEO, B. M.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M. F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. **Nat Med**, v. 13, n. 10, p. 1219-1227, 2007.

BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G. L.; MCHUGH, P. E.; SHAW, G.; BARRY, F. P.; MCNAMARA, L. M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **Eur Cell Mater**, v. 23, p. 13-27, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURG, K. J.; HOLDER, W. D., JR.; CULBERSON, C. R.; BEILER, R. J.; GREENE, K. G.; LOEBSACK, A. B.; ROLAND, W. D.; EISELT, P.; MOONEY, D. J.; HALBERSTADT, C. R. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n. 4, p. 642-649, 2000.

CASTANO-IZQUIERDO, H.; ALVAREZ-BARRETO, J.; VAN DEN DOLDER, J.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G.; SIKAVITSAS, V. I. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. **J Biomed Mater Res A**, v. 82, n. 1, p. 129-138, 2007.

CATERSON, E. J.; NESTI, L. J.; ALBERT, T.; DANIELSON, K.; TUAN, R. Application of mesenchymal stem cells in the regeneration of musculoskeletal tissues. **MedGenMed**, p. E1, 2001.

CHEN, K.; TEH, T. K.; RAVI, S.; TOH, S. L.; GOH, J. C. Osteochondral interface generation by rabbit bone marrow stromal cells and osteoblasts coculture. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 17-18, p. 1902-1911, 2012.

COLLINS, J. M.; RUSSELL, B. Stem cell therapy for cardiac repair. **J Cardiovasc Nurs**, v. 24, n. 2, p. 93-97, 2009.

COOPER, G. M.; MOONEY, M. P.; GOSAIN, A. K.; CAMPBELL, P. G.; LOSEE, J. E.; HUARD, J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plast Reconstr Surg**, v. 125, n. 6, p. 1685-1692, 2010.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; SHAKIBAEI, M. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. **Histochem Cell Biol**, v. 131, n. 2, p. 251-266, 2009.

CUERQUIS, J.; ROMIEU-MOUREZ, R.; FRANCOIS, M.; ROUTY, J. P.; YOUNG, Y. K.; ZHAO, J.; ELIOPOULOS, N. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 191-202, 2014.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-2213, 2006.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater**, v. 2, n. 3, p. 187-208, 1991.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.

DE OLIVEIRA, P. T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-413, 2004.

DE OLIVEIRA, P. T.; ZALZAL, S. F.; IRIE, K.; NANJI, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem**, v. 51, n. 5, p. 633-641, 2003.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A. M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-3843, 2002.

DUCY, P.; GEOFFROY, V.; KARSENTY, G. Study of osteoblast-specific expression of one mouse osteocalcin gene: characterization of the factor binding to OSE2. **Connect Tissue Res**, v. 35, n. 1-4, p. 7-14, 1996.

DUCY, P.; STARBUCK, M.; PRIEMEL, M.; SHEN, J.; PINERO, G.; GEOFFROY, V.; AMLING, M.; KARSENTY, G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. **Genes Dev**, v. 13, n. 8, p. 1025-1036, 1999.

FIEDLER, J.; RODERER, G.; GUNTHER, K. P.; BRENNER, R. E. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. **J Cell Biochem**, v. 87, n. 3, p. 305-312, 2002.

FINN, M. D.; SCHOW, S. R.; SCHNEIDERMAN, E. D. Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 6, p. 608-612, 1992.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 649-658, 2004.

GARBUZ, D. S.; MASRI, B. A.; CZITROM, A. A. Biology of allografting. **Orthop Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 199-204, 1998.

GAZDAG, A. R.; LANE, J. M.; GLASER, D.; FORSTER, R. A. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 1995.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Angiogenesis and bone growth. **Trends Cardiovasc Med**, v. 10, n. 5, p. 223-228, 2000.

GERSTENFELD, L. C.; CRUCETA, J.; SHEA, C. M.; SAMPATH, K.; BARNES, G. L.; EINHORN, T. A. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 2, p. 221-230, 2002.

GIL-ALBAROVA, J.; GIL-ALBAROVA, R. Donor site reconstruction in iliac crest tricortical bone graft: surgical technique. **Injury**, v. 43, n. 6, p. 953-956, 2012.

GOLDBERG, H. A.; HUNTER, G. K. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, v. 760, p. 305-308, 1995.

GREENBAUM, M. A.; KANAT, I. O. Current concepts in bone healing. Review of the literature. **J Am Podiatr Med Assoc**, v. 83, n. 3, p. 123-129, 1993.

HAMADE, E.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BUCHET, R.; ROUX, B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 9, p. 2082-2090, 2003.

HAUSAMEN, J. E.; NEUKAM, F. W. [Transplantation of bones]. **Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl**, v. 1, p. 163-177, 1992.

HEINO, T. J.; HENTUNEN, T. A.; VAANANEN, H. K. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. **Exp Cell Res**, v. 294, n. 2, p. 458-468, 2004.

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**, v. 87, n. 7, p. 1430-1437, 2005a.

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**, v. 87, n. 7, p. 896-902, 2005b.

HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 18, p. 8562-8565, 1993.

IKEHARA, S. The future of stem cell transplantation in autoimmune disease. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 38, n. 2-3, p. 292-297, 2010.

ILMER, M.; KAROW, M.; GEISSLER, C.; JOCHUM, M.; NETH, P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 9, p. 2397-2409, 2009.

IN 'T ANKER, P. S.; NOORT, W. A.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; KRUISSELBRINK, A. B.; VAN BEZOOIJEN, R. L.; BEEKHUIZEN, W.; WILLEMZE, R.; KANHAI, H. H.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, v. 88, n. 8, p. 845-852, 2003.

JANICKI, P.; SCHMIDMAIER, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S77-81, 2011.

KARP, J. M.; SARRAF, F.; SHOICHET, M. S.; DAVIES, J. E. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study. **J Biomed Mater Res A**, v. 71, n. 1, p. 162-171, 2004.

KIM, H.; LEE, J. H.; SUH, H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. **Yonsei Med J**, v. 44, n. 2, p. 187-197, 2003.

KIM, I.; LEE, S. K.; YOON, J. I.; KIM DA, E.; KIM, M.; HA, H. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 21-22, p. 2373-2381, 2013.

KIM, S. J.; SHIN, Y. W.; YANG, K. H.; KIM, S. B.; YOO, M. J.; HAN, S. K.; IM, S. A.; WON, Y. D.; SUNG, Y. B.; JEON, T. S.; CHANG, C. H.; JANG, J. D.; LEE, S. B.; KIM, H. C.; LEE, S. Y. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron) injection to treat fractures. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 10, p. 20, 2009.

KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S.; YAMAGUCHI, A.; SASAKI, K.; DEGUCHI, K.; SHIMIZU, Y.; BRONSON, R. T.; GAO, Y. H.; INADA, M.; SATO, M.; OKAMOTO, R.; KITAMURA, Y.; YOSHIKI, S.; KISHIMOTO, T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-764, 1997.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Principles of Tissue Engineering**. 4th ed. Norfolk: Academic Press, 2013.

LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M.; RINGDEN, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, 2004.

LEE, H. S.; HUANG, G. T.; CHIANG, H.; CHIOU, L. L.; CHEN, M. H.; HSIEH, C. H.; JIANG, C. C. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. **Stem Cells**, v. 21, n. 2, p. 190-199, 2003.

LEE, J. Y.; CHOI, M. H.; SHIN, E. Y.; KANG, Y. K. Autologous mesenchymal stem cells loaded in Gelfoam((R)) for structural bone allograft healing in rabbits. **Cell Tissue Bank**, v. 12, n. 4, p. 299-309, 2011.

LIAO, J.; HAMMERICK, K. E.; CHALLEN, G. A.; GOODELL, M. A.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Investigating the role of hematopoietic stem and progenitor cells in regulating the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. **J Orthop Res**, v. 29, n. 10, p. 1544-1553, 2011.

LIND, M.; DELEURAN, B.; THESTRUP-PEDERSEN, K.; SOBALLE, K.; ERIKSEN, E. F.; BUNGER, C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. **APMIS**, v. 103, n. 2, p. 140-146, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUNDGREN, S.; ANDERSSON, S.; GUALINI, F.; SENNERBY, L. Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 6, n. 3, p. 165-173, 2004.

LYNCH, S. E.; MARX, R. E.; NEVINS, M.; WISNER-LYNCH, L. A. **Tissue Engineering: Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontic**. 2nd ed. Hanover Park: Quintessence, 2008.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res**, v. 254, n. 2, p. 317-330, 1988.

MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 98-105, 2008.

MAYR-WOHLFART, U.; WALTENBERGER, J.; HAUSSER, H.; KESSLER, S.; GUNTHER, K. P.; DEHIO, C.; PUHL, W.; BRENNER, R. E. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. **Bone**, v. 30, n. 3, p. 472-477, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MROZIK, K. M.; WADA, N.; MARINO, V.; RICHTER, W.; SHI, S.; WHEELER, D. L.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. **Regen Med**, v. 8, n. 6, p. 711-723, 2013.

NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R.; DE CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17-29, 2002.

OE, K.; MIWA, M.; SAKAI, Y.; LEE, S. Y.; KURODA, R.; KUROSAKA, M. An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. **J Bone Joint Surg Br**, v. 89, n. 1, p. 133-138, 2007.

OZAKI, Y.; NISHIMURA, M.; SEKIYA, K.; SUEHIRO, F.; KANAWA, M.; NIKAWA, H.; HAMADA, T.; KATO, Y. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 16, n. 1, p. 119-129, 2007.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization

of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**, v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987.

PELISSIER, P.; VILLARS, F.; MATHOULIN-PELISSIER, S.; BAREILLE, R.; LAFAGE-PROUST, M. H.; VILAMITJANA-AMEDEE, J. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. **Plast Reconstr Surg**, v. 111, n. 6, p. 1932-1941, 2003.

PONTICIELLO, M. S.; SCHINAGL, R. M.; KADIYALA, S.; BARRY, F. P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. **J Biomed Mater Res**, v. 52, n. 2, p. 246-255, 2000.

POULSOM, R.; ALISON, M. R.; COOK, T.; JEFFERY, R.; RYAN, E.; FORBES, S. J.; HUNT, T.; WYLES, S.; WRIGHT, N. A. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 14 Suppl 1, p. S48-54, 2003.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

QIN, S.; JIANG, H.; SU, S.; WANG, D.; LIANG, Z.; ZHANG, J.; YANG, W. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation by bone marrow mesenchymal stem cells via regulation of the cell cycle in rat. **Exp Ther Med**, v. 4, n. 3, p. 375-380, 2012.

ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M. V.; MASON, R. S. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. **J Mater Sci Mater Med**, v. 19, n. 3, p. 1173-1182, 2008.

ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2003.

ROSA, A. L.; DE OLIVEIRA, P. T.; BELOTI, M. M. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. **Expert Rev Med Devices**, v. 5, n. 6, p. 719-728, 2008.

SADIE-VAN GIJSEN, H.; CROWTHER, N. J.; HOUGH, F. S.; FERRIS, W. F. The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 13, p. 2331-2349, 2013.

SAKAI, S.; MISHIMA, H.; ISHII, T.; AKAOGI, H.; YOSHIOKA, T.; UEMURA, T.; OCHIAI, N. Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. **Acta Orthop**, v. 79, n. 3, p. 445-448, 2008.

SAUERBIER, S.; STRICKER, A.; KUSCHNIERZ, J.; BUHLER, F.; OSHIMA, T.; XAVIER, S. P.; SCHMELZEISEN, R.; GUTWALD, R. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 16, n. 2, p. 215-223, 2010.

SCHANTZ, J. T.; WOODRUFF, M. A.; LAM, C. X.; LIM, T. C.; MACHENS, H. G.; TEOH, S. H.; HUTMACHER, D. W. Differentiation potential of mesenchymal progenitor

cells following transplantation into calvarial defects. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 11, p. 132-142, 2012.

SENSEBE, L.; BOURIN, P.; TARTE, K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. **Hum Gene Ther**, v. 22, n. 1, p. 19-26, 2011.

SICCHIERI, L. G.; CRIPPA, G. E.; DE OLIVEIRA, P. T.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 6, n. 2, p. 155-162, 2012.

SOHN, D. S.; MOON, J. W.; MOON, K. N.; CHO, S. C.; KANG, P. S. New bone formation in the maxillary sinus using only absorbable gelatin sponge. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, n. 6, p. 1327-1333, 2010.

SPAGGIARI, G. M.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MORETTA, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, n. 26, p. 6576-6583, 2009.

STOCKMANN, P.; PARK, J.; VON WILMOWSKY, C.; NKENKE, E.; FELSZEGHY, E.; DEHNER, J. F.; SCHMITT, C.; TUDOR, C.; SCHLEGEL, K. A. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - a comparison of different tissue sources. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 40, n. 4, p. 310-320, 2012.

STUTCHFIELD, B. M.; FORBES, S. J.; WIGMORE, S. J. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. **Liver Transpl**, v. 16, n. 7, p. 827-836, 2010.

SUN, J.; ZHOU, H.; DENG, Y.; ZHANG, Y.; GU, P.; GE, S.; FAN, X. Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells transiently retards osteoblast differentiation by downregulating runx2. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 6, p. 510-522, 2012.

SUN, Z.; TEE, B. C.; KENNEDY, K. S.; KENNEDY, P. M.; KIM, D. G.; MALLERY, S. R.; FIELDS, H. W. Scaffold-based delivery of autologous mesenchymal stem cells for mandibular distraction osteogenesis: preliminary studies in a porcine model. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74672, 2013.

TAI, G.; POLAK, J. M.; BISHOP, A. E.; CHRISTODOULOU, I.; BUTTERY, L. D. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. **Tissue Eng**, v. 10, n. 9-10, p. 1456-1466, 2004.

TAKAHARA, K.; II, M.; INAMOTO, T.; KOMURA, K.; IBUKI, N.; MINAMI, K.; UEHARA, H.; HIRANO, H.; NOMI, H.; KIYAMA, S.; ASAH, M.; AZUMA, H. Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 446, n. 4, p. 1102-1107, 2014.

TANG, Y. L.; ZHAO, Q.; ZHANG, Y. C.; CHENG, L.; LIU, M.; SHI, J.; YANG, Y. Z.; PAN, C.; GE, J.; PHILLIPS, M. I. Autologous mesenchymal stem cell transplantation

induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. **Regul Pept**, v. 117, n. 1, p. 3-10, 2004.

TORTELLI, F.; TASSO, R.; LOIACONO, F.; CANCEDDA, R. The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2010.

TROUM, S.; DALTON, M. L., JR. Osteogenesis in a rat model: use of bone marrow cells and biodegradable gelatin matrix carrier. **J South Orthop Assoc**, v. 10, n. 1, p. 37-43, 2001.

TSAI, M. T.; LIN, D. J.; HUANG, S.; LIN, H. T.; CHANG, W. H. Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell-cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells. **Int Orthop**, v. 36, n. 1, p. 199-205, 2012.

UNDALE, A. H.; WESTENDORF, J. J.; YASZEMSKI, M. J.; KHOSLA, S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 10, p. 893-902, 2009.

WANG, K.; GUAN, Y.; LIU, Y.; ZHU, M.; LI, T.; AN, D.; OU, L.; CHE, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, J.; ZHENG, X. L.; KONG, D. Fibrin glue with autogenic bone marrow mesenchymal stem cells for urethral injury repair in rabbit model. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 23-24, p. 2507-2517, 2012.

WANG, Y.; YAO, J.; YUAN, M.; ZHANG, Z.; HU, W. Osteoblasts can induce dental pulp stem cells to undergo osteogenic differentiation. **Cytotechnology**, v. 65, n. 2, p. 223-231, 2013.

YANG, T. H.; MIYOSHI, H.; OHSHIMA, N. Novel cell immobilization method utilizing centrifugal force to achieve high-density hepatocyte culture in porous scaffold. **J Biomed Mater Res**, v. 55, n. 3, p. 379-386, 2001.

YU, J. Z.; WU, H.; YANG, Y.; LIU, C. X.; LIU, Y.; SONG, M. Y. Osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells regulated by osteoblasts under EMF exposure in a co-culture system. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 34, n. 2, p. 247-253, 2014.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.120.53.1), intitulado: "Efeitos da Terapia Celular com a Associação de Células-Tronco Mesenquimais e Osteoblastos no Reparo do Tecido Ósseo", de autoria de **Thiago de Santana Santos** e de **Adalberto Luiz Rosa**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04.07.2013.

Colaboradores: Márcio Mateus Beloti;
Paulo Tambasco de Oliveira;
Adriana Luisa Gonçalves de Almeida;
Fabíola Singaretti de Oliveira;
Milla Sprone Tavares;
Roger Rodrigo Fernandes

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.120.53.1), entitled: "Efeitos da Terapia Celular com a Associação de Células-Tronco Mesenquimais e Osteoblastos no Reparo do Tecido Ósseo", by **Thiago de Santana Santos** and **Adalberto Luiz Rosa**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 4 2013.

Ribeirão Preto, 16 de julho de 2013.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO B

Resumo da produção científica durante o doutorado:

1. Artigos publicados em periódicos:

SEHN, F. P.; DIAS, R. R.; SANTOS, T. S.; XAVIER, S. P. Oral bisphosphonate-related mandible fracture. **J Craniofac Surg**, v. 25, n. 2, p. 709-711, 2014.

SANTOS, T. S.; SILVA, E. R.; FARIA, A. C. ; MELLO FILHO, F. V.; XAVIER, S. P. Multiple supernumerary teeth in a nonsyndromic 12-year-old female patient - a case report. **Braz Dental J**, v. 25, n. 1, p. 79-82, 2014.

XAVIER, S. P.; PONTES, C. B.; SILVA, E. R.; SANTOS, T. S.; ZATITI, S. C.; MELLO FILHO, F. V. Three-stage mandible reconstruction after firearm injury. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 1, p. e87-e88, 2013.

XAVIER, S. P.; FARIA, A. C.; SILVA, E. R.; SANTOS, T. S.; MELLO FILHO, F. V. Recurrence of ameloblastoma in soft tissue. **J Craniofac Surg**, v. 24, n. 5, p. 1866-1867, 2013.

FERRAZ, E. P.; ROSA, A. L.; DE OLIVEIRA, P. T.; SANTOS, T. S.; PONTES, C. B.; REINO, D. M.; XAVIER, S. P. Clinical, histological and cellular evaluation of vertico-lateral maxillary reconstruction associating alveolar osteogenic distraction and fresh-frozen bone allograft. **J Oral Implantol**, 2013. No prelo.

LOPES, H. B.; SANTOS, T. S.; OLIVEIRA, F. S.; FREITAS, G. P.; ALMEIDA, A. L. G.; GIMENES, R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation. **J Biomat Appl**, 2013. No prelo.

2. Artigos aceitos para publicação:

XAVIER, S. P.; SANTOS, T. S.; FARIA, A. C.; MELLO FILHO, F. V. Two-stage treatment of severe facial deformity caused by unilateral condylar hyperplasia. **Braz Dental J**, 2014.

SANTOS, T. S.; SEHN, F. P.; DIAS, R. R.; XAVIER, S. P. Volume increase of dentigerous cyst following decompression. **J Craniofac Surg**, 2014.

3. Resumos publicados em anais de congressos:

SANTOS, T. S.; LOPES, H. B.; ALMEIDA, A. L.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Microtomography analysis of bone formation in calvarial defects filled with gelatin sponge or fibrin glue. In: The European Calcified Tissue Society, Annual Congress 2013, 2013, Lisboa. **Bone Abstracts**, 2013. v. 1. p. P63-P63.

SANTOS, T. S.; FERRAZ, E. P.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T.; XAVIER, S. P. Avaliação das respostas celulares do reparo do tecido ósseo após distração osteogênica e enxerto ósseo homólogo. In: XXII COBRAC - Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, 2013, Rio de Janeiro. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, 2013. v. 13. p. 302-302.

LOPES, H. B.; SANTOS, T.S.; OLIVEIRA, F. S.; FREITAS, G. P.; ALMEIDA, A. L. G.; GIMENES, R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane on in vivo bone formation. In: 4th International Symposium on Surfaces and Interfaces for Biomaterials, 2013, Roma. **European Cells and Materials**, 2013. v. 16. p. 74-74.

LOPES, H. B.; SANTOS, T. S.; FREITAS, G. P.; OLIVEIRA, F. S.; GIMENES, R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Gene Expression Analysis of Bone Tissue Grown on P(VDF-TrFE)/BT Membrane Implanted in Rat Calvarial Defects. In: AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons) 95th Annual Meeting, 2013. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2013. v. 71. p. e88-e89.

SANTOS, T. S.; OLIVEIRA, F. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Mesenchymal Stem Cell Upregulates Osteoblast Gene Expression in a Direct Co-culture System. In: AAOMS (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons) 95th Annual Meeting, 2013, Orlando. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2013. v. 71. p. e84-e85.

SANTOS, T. D. S.; Fernandes, R. R.; Beloti, M. M.; Rosa , A. L. Effect of direct co-culture of mesenchymal stem cells and osteoblasts on the osteoblast phenotype expression. In: 39th Annual Congress of European Calcified Tissue Society, 2012, Stockholm. **Bone** (New York, N.Y.). v. 50. p. S68-S68.

SANTOS, T. S.; FERNANDES, R. R.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Effect of Association of Undifferentiated Stem Cells and Differentiated Osteoblasts on the Osteoblast Phenotype Expression. In: AAOMS 94th Annual Meeting, 2012, San Diego. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2012. v. 70. p. e91-e91.