UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

EMANUELA PRADO FERRAZ

**Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato® com
duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos**

RIBEIRÃO PRETO

2016

EMANUELA PRADO FERRAZ

Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos

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

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2016

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ferraz, Emanuela Prado

Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos. Ribeirão Preto, 2016.

111 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz.

1 biosilicato; 2. célula-tronco mesenquimal; 3. osteoblasto; 4. arcabouço; 5. regeneração óssea; 6. engenharia de tecido

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferraz, Emanuela Prado

Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos

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

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular, LAB 3D BIO, no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Epigenética da Universidade do Alabama em Birmingham – UAB, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos FAPESP nº 2012/23525-9; 2012/23879-5; 2014/03039-6.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adalberto L. Rosa, por ter aceitado me orientar por todos esses anos e por não ter desistido de mim. Terá sempre meu respeito, meu carinho, minha admiração, minha gratidão e minha amizade. Muito obrigada, por tudo.

Ao Prof. Dr. Márcio, obrigada por acreditar no meu trabalho. Mais que um professor, é um grande amigo por quem eu tenho imensa admiração e respeito.

To Prof. Dr. Mohammad Q. Hassan. I will always be thankful for you, for encouraging me to learn more and work hard. I am so lucky to have met this great family during my internship. Thank you all.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, muito obrigada pela amizade e pelo aprendizado constante.

Aos grandes amigos Adriana, Fabíola, Larissa Castro, Lucas, Larissa Sverzut, Rodrigo, Roger e Tatiana, por serem há anos, meus amigos além da bancada. Sem a ajuda de vocês, essas páginas estariam em branco. E meus dias vazios.

Aos meus colegas de pós-graduação Thiago, Helena, Gileade, Daniel, Heitor, Allan, pela companhia e paciência.

Aos alunos de Iniciação científica Denise, Leonardo e Marcelo, por sempre estarem dispostos a ajudar e aprender. Vocês terão um futuro brilhante.

Às queridas Clélia, Daniela, Dulce, Isabel, Regiane, Rosângela e D. Sueli, por toda ajuda prontamente prestada. Muito obrigada.

Aos colaboradores docentes e alunos do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. Edgar Dutra Zanotto, Prof. Dr. Oscar Peitl Filho e Dr. Murilo Crovace, por prepararem e fornecerem o material para a realização dos ensaios propostos.

Aos colaboradores docentes e alunos do Hemocentro de Ribeirão Preto, Prof. Dr. Dimas Covas, Dr. Lucas Souza e Dra. Daniele, pelo auxílio e dedicação nos experimentos envolvendo bioluminescência.

Aos profissionais técnicos Paulo, Aline, Sebastião, Milla, Dimitrius, por todo o apoio e ajuda prontamente prestadas.

Ao Gustavo, que sempre dispõe do seu tempo para me ajudar no que for preciso, e para me transmitir um pouco do seu imenso conhecimento em anatomia humana. Muito obrigada por tudo, e espero podermos continuar trabalhando juntos.

Aos meus colegas e alunos do Curso de Odontologia da Universidade de Franca, obrigada pela convivência harmoniosa e pela oportunidade de desenvolver as atividades de docência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro fundamental para a execução desse projeto no Brasil e no exterior.

À minha família, Mara, Antonio, Thiago, Andreia, Felipe, Alice e Geórgia; Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas.

Ao Rogério, meu grande parceiro. Sua paciência e bom humor são fundamentais para eu possa executar qualquer projeto. Você faz tudo sempre valer a pena.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

RESUMO

FERRAZ, EP. **Engenharia de tecidos: efeito da associação entre células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sobre o reparo de defeitos ósseos.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016. 111 f.

A crescente demanda clínica para regeneração óssea tem dirigido esforços significativos para o desenvolvimento de novos biomateriais, incluindo aqueles aplicados em terapias baseadas em engenharia de tecidos. Neste contexto, os biovidros são considerados uma boa alternativa mas as suas propriedades mecânicas têm limitado a sua aplicação. Para melhorar tais propriedades sem afetar a biocompatibilidade, um novo material vitrocerâmico bioativo do sistema P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 , chamado Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) foi desenvolvido. No entanto, os efeitos da adição das fases cristalinas sobre o comportamento biológico do BioS-2P ainda não foram estudados. Assim, os objetivos deste estudo foram investigar a capacidade do BioS-2P em induzir, *in vitro*, a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (CTMs); a capacidade do BioS-2P em aumentar, *in vitro*, a atividade dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) e osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs); e a capacidade do BioS-2P em conduzir e induzir a neoformação óssea, *in vivo*, associado ou não a células. Células derivadas da medula óssea obtidas de fêmures de ratos foram cultivadas em meio de crescimento para obtenção de CTMs ou em meio osteogênico para obtenção de OBs. Essas células e UMRs foram cultivadas sobre discos de BioS-2P, Bioglass® 45S5 (45S5) e plástico de cultura (Controle) e utilizadas nas avaliações *in vitro*. Para as avaliações *in vivo*, defeitos de 5 mm criados em calotas de ratos foram implantados somente com arcabouços de BioS-2P ou com arcabouços de BioS-2P associados às CTMs ou aos OBs. Os dados foram comparados por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, e o nível de significância adotado foi de 5%. As CTMs foram caracterizadas por apresentarem alta porcentagem de células expressando os marcadores de superfície CD29 e CD90 e baixa porcentagem expressando CD31, CD34, CD45 e CD106. A diferenciação osteoblástica das CTMs foi confirmada pela expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica fosfatase alcalina (ALP), runt-related transcript factor-2 (RUNX2), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OC). CTMs cultivadas sobre discos de BioS-2P em meio não-osteogênico apresentaram diminuição da proliferação e aumento da atividade de ALP e da expressão dos

genes marcadores da diferenciação osteoblástica ALP, RUNX2, osterix (OSX), proteína óssea morfogenética-4 (BMP-4), osteopontina (OPN) e OC, comprovando seu potencial osteoindutor similar ao 45S5. O BioS-2P foi capaz de aumentar a atividade de OBs e UMRs de maneira similar àqueles cultivados sobre o 45S5. OBs apresentaram diminuição na proliferação e aumento da atividade da ALP e da expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC. A análise em larga escala da expressão de mais de 23.000 genes mostrou que o BioS-2P induziu a sobre-expressão de genes envolvidos no aumento da atividade osteoblástica e a repressão de genes envolvidos na diminuição dessa atividade, em comparação com o Controle. Ao menos em parte, esse aumento da atividade osteoblástica foi atribuído à modulação das vias de sinalização proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e Wnt Canônica, e à modulação da expressão de microRNAs. UMRs crescidos sobre o BioS-2P corroboraram esses achados, pela capacidade em formar matriz mineralizada e por apresentarem aumento na expressão das proteínas ALP, RUNX2, dentin matrix protein-1 (DMP-1) e OPN. Arcabouços de BioS-2P (5 mm de diâmetro e 2 mm de altura com porosidade de $76 \pm 5\%$ e com tamanhos de poros variando entre 100 e 800 μm) implantados em defeitos na calota de ratos estimularam a formação de tecido ósseo, que ocorreu tanto na periferia como no interior dos defeitos e em íntimo contato com o material. A morfometria por microtomografia computadorizada não evidenciou qualquer diferença entre os parâmetros volume ósseo, volume ósseo/volume total, superfície óssea, superfície/volume ósseo, número de trabéculas, separação trabecular e espessura trabecular, avaliados na 4^a, 8^a e 12^a semanas de implantação. As CTMs e os OBs foram carreados para os arcabouços de BioS-2P (com eficiência de 90% e 81%, respectivamente) e essas células permaneceram nos defeitos por 14 dias. A combinação de arcabouços de BioS-2P com CTMs ou OBs, implantados por 8 semanas, resultou no mesmo padrão de formação óssea daquele observado para o arcabouço sem células. No entanto, essa combinação não resultou em aumento na quantidade de osso formado. Os resultados evidenciaram a capacidade do BioS-2P em induzir a diferenciação osteoblástica de CTMs e estimular a atividade osteoblástica de OBs, o que resultaria na neoformação óssea observada *in vivo*. No entanto, a combinação de BioS-2P com CTMs e OBs não foi capaz de aumentar a formação óssea e induzir o reparo dos defeitos ósseos.

Palavras chave: biosilicato; célula-tronco mesenquimal; osteoblasto; arcabouço; regeneração óssea; engenharia de tecido

ABSTRACT

FERRAZ, EP. **Tissue engineering: the effect of the association between cells and Biosilicate® with two crystalline phases (BioS-2P) on bone repair.** Thesis (Doctor's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2016. 111 f.

The increasing clinical demand for bone regeneration has driven significant efforts to develop new biomaterials including those for tissue engineering-based therapies. In this context, bioglasses emerges as a good alternative, but their use has been limited mainly due their poor mechanical properties. To improve these mechanical properties without affecting biocompatibility, a novel bioactive glass-ceramic of the P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 system, named Biosilicate® with two crystalline phases (BioS-2P) was developed. However, the effects of these two phases on BioS-2P biological behavior have not yet been evaluated. Thus, the aims of this study were to investigate the BioS-2P capability of inducing *in vitro* mesenchymal stem cell differentiation (MSC) towards osteoblasts; the BioS-2P capability to increase *in vitro* activity of osteoblasts derived from rat bone marrow at early stages of differentiation (OBs) and osteoblasts from rat cell line UMR-106 (UMRs); and the BioS-2P capability to drive and induce bone formation *in vivo*, associated or not with cells. Bone marrow cells harvested from rat femurs were cultured either in growth media to obtain MSCs or in osteogenic media to obtain OBs. MSCs, OBs and UMRs were cultured on discs of BioS-2P, Bioglass® 45S5 (45S5) and tissue culture polystyrene (Control). For *in vivo* evaluations, 5-mm rat calvarial surgical defects were filled with BioS-2P with or without MSCs or OBs. Data were compared by non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Student Newman-Keuls test and the significance level was set at 5%. MSCs were characterized by presenting high percentage of CD29 and CD90 surface markers and low percentage of CD31, CD34, CD45 and CD106 surface markers. Osteoblastic differentiation of MSCs was detected by gene expression of bone markers alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OC). MSCs cultured on Bios-2P discs under non-osteogenic conditions exhibited a decrease on cell proliferation and an increase on ALP activity and gene expression of bone markers ALP, RUNX2, osterix (OSX), bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), osteopontin (OPN) and OC, confirming its osteoinductive potential similar to 45S5. Also, BioS-2P increased the OBs and UMRs activity, similar to 45S5. OBs cultured on Bios-2P discs presented a decrease in cell proliferation and an increase on ALP activity and gene expression of bone markers RUNX2, OSX, BMP-4, OPN and OC. The large-scale analysis of over 23,000 genes

showed that the BioS-2P induced overexpression of genes positively related to osteoblastic activity and repression of genes negatively related with its activity, compared with control. At least in part, the increase on OBs activity was associated to the modulation of two main signaling pathways, the mitogen activated protein kinases (MAPK) and the Canonical Wnt, and the modulation of microRNAs expression. These findings were corroborated by UMRs grown on BioS-2P, which produced mineralized matrix and exhibited increased expression of the ALP, RUNX2, dentin matrix protein-1 (DMP-1) and OPN proteins, than on control. BioS-2P scaffolds (5 mm diameter and 2 mm height, presenting $76 \pm 5\%$ of total porosity, with pores size ranging from 100 to 800 μm) implanted in calvarial defects promoted new bone formation in close contact with BioS-2P, both on periphery and in the center of the defect. The computed microtomography morphometry showed no difference between the evaluated parameters bone volume, bone volume / total volume, bone surface, surface / bone volume, number of trabeculae, trabecular separation and trabecular thickness, measured at 4, 8 and 12 weeks. MSCs and OBs were seeded into the scaffold (with efficiency of incorporation 90% and 81%, respectively) and they remained on the defects for 14 days. After 8 weeks, the same pattern of bone formation was observed, however, the combination of BioS-2P with cells did not increase the amount of new bone. The results showed the BioS-2P ability to induce osteoblastic differentiation of MSCs and to stimulate osteoblastic activity, resulting in new bone formation *in vivo*. However, the combination of BioS-2P with MSCs and OBs was not able to increase bone formation and induce the repair of bone defects.

Keywords: biosilicate; mesenchymal stem cell; osteoblast; scaffold; bone regeneration; tissue engineering

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas a partir da medula óssea de ratos e cultivadas por 7 e 14 dias. A. Os histogramas mostram a expressão de CD29, CD90, CD31, CD34, CD45 e CD106 das CTMs. B. Os números indicam a porcentagem de CTMs marcadas. _____ 31

Figura 1.2. Expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, BSP e OC) dos osteoblastos em estágio inicial de diferenciação (OBs) derivados de medula óssea de rato, aos 10 dias de cultivo. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4). _____ 32

Figura 2.1. Proliferação das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). _____ 39

Figura 2.2. Atividade de fosfatase alcalina das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). _____ 39

Figura 2.3. Aspectos macroscópicos e quantificação da atividade de fosfatase alcalina *in situ* das culturas das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias, coradas por Fast Red. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). _____ 40

Figura 2.4. Avaliação da integridade do RNA total das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os picos identificados nos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (RNA Integrity Number) representam a qualidade das amostras de RNA total. _____ 40

Figura 2.5. Expressão relativa dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC) das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre

o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes das CTMs crescidas sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._____ 41

Figura 3.1. Morfologia dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 24 h (A-C), 3 dias (D-F) e 5 dias (G-I) sobre o plástico de cultura (Controle) (A,D,G), discos de 45S5 (B,E,H) e discos de BioS-2P (C-F-I). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI). Aumento de 20x. Barra: 100 μ m._____ 54

Figura 3.2. Proliferação dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____ 54

Figura 3.3. Atividade de fosfatase alcalina dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____ 55

Figura 3.4. Aspectos macroscópicos e quantificação da atividade de fosfatase alcalina *in situ* das culturas dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs), crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias e corados por Fast Red. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____ 55

Figura 3.5. Avaliação da integridade do RNA total dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os picos identificados nos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (RNA Integrity Number) representam a qualidade das amostras de RNA total._____ 56

Figura 3.6. Expressão relativa dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os

valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._____57

Figura 3.7. Expressão relativa dos genes envolvidos na via de sinalização MAPK (MAPK-1; MAPK-3; MAPK-8; MAPK-14) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._____58

Figura 3.8. Expressão relativa dos genes envolvidos na via de sinalização Wnt Canônica (LPR-5; SFPR-1; AXIN-1; GSK- β ; β -CATENINA; ILK; DKK-1; SOST) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._____59

Figura 3.9. Expressão relativa dos genes selecionados para validação do sequenciamento (DMP-1, PHOSPHO-1, CD-24 e MYH-11) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._____62

Figura 3.10. Expressão relativa dos microRNAs relacionados com o processo de osteogênese dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo small nuclear U6 e calibrados em relação à expressão dos miRs dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)._63

Figura 3.11. Fotomicrografias obtidas pela MEV evidenciam a produção de nódulos de matriz mineralizada pelos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias. As imagens nos insets evidenciam o material submetido às mesmas condições de cultivo, mas sem células. Os asteriscos (*) indicam as superfícies dos materiais. _____65

Figura 3.12. Nódulos de matriz mineralizada produzidos pelos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias, e sua quantificação. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). _____66

Figura 3.13. Detecção das proteínas ALP (indicada com asteriscos) e OPN (indicada nas cabeças das setas) por imunofluorescência, nos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o Thermanox (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias. Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI). Aumento de 20x. Barra: 100 μ m. _____67

Figura 3.14. (A) Detecção das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot e (B) quantificação relativa em relação à expressão de GAPDH, nos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias. _____67

Figura 4.1. Reconstruções tridimensionais obtidas do arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P). _____76

Figura 4.2. Distribuição dos diferentes tamanhos dos poros por porcentagem. _____76

Figura 4.3. Reconstruções microtomográficas (A-C) e cortes tomográficos axiais (D-F) e sagitais (G-I) dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e mantidos por 4 (A, D, G), 8 (B, E, H) e 12 semanas (C, F, I). Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. _____77

Figura 4.4. Parâmetros morfométricos obtidos por microtomografia computadorizada, após reconstrução do tecido ósseo neoformado nos defeitos criados em calotas de ratos e implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), após 4, 8 e

12 semanas. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significante em nenhum dos parâmetros avaliados (Kruskal Wallis, $p \geq 0,05$)._____78

Figura 4.5. Fotomicrografias dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e mantidos por 4 (A, D, G), 8 (B, E, H) e 12 semanas (C, F, I). Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. A-C 1,6x; D-F 2,5x; G-I 10x. Barra 100 μ m. _____79

Figura 4.6. Fotomicrografias que evidenciam a resposta tecidual aos arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), implantados em região intramuscular e mantido por 8 semanas. Nota-se a presença de grande quantidade de tecido conjuntivo e ausência de tecido ósseo neoformado. As setas indicam a presença do material remanescente e os asteriscos (*) indicam a presença de células multinucleadas ao redor de toda a superfície do material. Coloração por vermelho de alizarina e azul de Stevenel. A,D: 2,5x; B,E: 10x; C,F: 20x. Barra 50 μ m. _____80

Figura 5.1. (A) Avaliação da quantidade de células-tronco mesenquimais (CTMs) e osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), após plaqueamento na densidade de 2×10^5 e incubação por 18 h. (B) OBs cultivados por 18 h e aderidos a um dos poros do arcabouço de BioS-2P. Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (Dapi). Imagem adquirida em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de ApoTome. Aumento de 20x. Barra: 100 μ m. _____86

Figura 5.2. Imagens e quantificação de bioluminescência emitida pelos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) transfectados com luciferase, incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e implantados em defeitos de calotas de ratos. Imagens obtidas após injeção local de 100 μ L luciferina (30mg/mL). _____87

Figura 5.3. Imagens de bioluminescência emitida pelos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) transfectados com luciferase, incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e implantados em dos defeitos de calotas de ratos. Imagens obtidas após injeção local de 100 μ L luciferina (30mg/mL), imediatamente após a eutanásia dos animais. _____87

Figura 5.4. Reconstruções microtomográficas (A-C) e cortes tomográficos axiais (D-F) e sagitais (G-I) dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem células (A, D, G), associado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas (CTMs) (B, E, H) e associado com osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) (C, F, I), todos mantidos por 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. _____ 88

Figura 5.5. Parâmetros morfométricos obtidos por microtomografia computadorizada, do tecido ósseo neoformado nos defeitos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem célula, BioS-2P associado às células-tronco mesenquimais indiferenciadas (CTMs) e BioS-2P associado aos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) após 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). _____ 89

Figura 5.6. Fotomicrografias dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem células (A, D, G), BioS-2P associado com células-tronco mesenquimais (B, E, H) e BioS-2P associado com osteoblastos em fase inicial de diferenciação (C, F, I) e mantidos por 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. A-C 1,6x; D-F 2,5x; G-I 10x. Barra 100 μm . _____ 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Sequência de nucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes relacionados com as vias MAPK e Wnt Canônica.....	47
Tabela 3.2. Sequência de nucleotídeos utilizados para a amplificação dos miRs.....	49
Tabela 3.3. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de 45S5, comparados com os OBs crescidos sobre o plástico de cultura (Controle).....	60
Tabela 3.4. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de BioS-2P, comparados com os OBs crescidos sobre o plástico de cultura (Controle).....	61
Tabela 3.5. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de BioS-2P, comparados com os OBs crescidos sobre discos de 45S5.	61
Tabela 4.1. Distribuição dos grupos em relação ao tempo experimental.....	72
Tabela 5.1. Distribuição dos grupos em relação ao tratamento.....	83

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
OBJETIVO GERAL	28
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CTMS E DOS OBS	
1.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	29
1.2. MATERIAL E MÉTODOS	29
1.2.1. Obtenção e cultura das CTMs e dos OBs derivados de medula óssea de ratos.	29
1.2.2. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo	30
1.2.3. Caracterização dos OBs por PCR em tempo real	30
1.3. RESULTADOS	31
1.3.1. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo	31
1.3.2. Caracterização dos OBs por PCR em tempo real	31
1.4. DISCUSSÃO	32
1.5. CONCLUSÃO	34
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO BIOS-2P NAS CTMS	
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	35
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.2.1. Preparação das amostras	35
2.2.2. Obtenção e cultura das CTMs derivadas de medula óssea de ratos	35
2.2.3. Proliferação celular	36
2.2.4. Medida da atividade de ALP	36
2.2.5. Detecção e quantificação da atividade de ALP <i>in situ</i>	37
2.2.6. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica	37
2.2.7. Análise estatística	38
2.3. RESULTADOS	38
2.3.1. Proliferação celular	38
2.3.2. Medida da atividade de ALP	39
2.3.3. Detecção e quantificação da atividade de ALP <i>in situ</i>	39
2.3.4. Avaliação da integridade do RNA total	40
2.3.5. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica	40
2.4. DISCUSSÃO	42

2.5. CONCLUSÃO	43
-----------------------	-----------

CAPÍTULO 3 - EFEITO DO BIOS-2P NOS OBS E UMRS

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	44
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.2.1. Preparação das amostras	44
3.2.2. Obtenção e cultura dos OBs derivados de CTMs	44
3.2.3. Avaliações do efeito do BioS-2P sobre os OBs	44
3.2.3.1. Morfologia celular por fluorescência direta	44
3.2.3.2. Proliferação Celular	45
3.2.3.3. Medida da atividade de ALP	45
3.2.3.4. Detecção e quantificação da atividade de ALP <i>in situ</i>	45
3.2.3.5. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica	45
3.2.3.6. Expressão de genes das vias de sinalização MAPK e Wnt Canônica	45
3.2.3.7. Expressão gênica em larga escala	47
3.2.3.8. Expressão de microRNAs (miRs) relacionados com o processo de osteogênese	49
3.2.4. Obtenção e cultura dos UMRs	49
3.2.5. Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os UMRs	50
3.2.5.1. Detecção e quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada	50
3.2.5.2. Detecção das proteínas ALP e OPN por Imunofluorescência	51
3.2.5.3. Detecção e quantificação das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot	51
3.2.6. Análise estatística	53
3.3. RESULTADOS	53
3.3.1. Avaliações do efeito do BioS-2P sobre os OBs	53
3.3.1.1. Morfologia celular por fluorescência direta	53
3.3.1.2. Proliferação celular	54
3.3.1.3. Medida da atividade de ALP	55
3.3.1.4. Detecção e quantificação da atividade de ALP <i>in situ</i>	55
3.3.1.5. Avaliação da integridade do RNA total	56
3.3.1.6. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica	56

3.3.1.7. Expressão de genes das vias de sinalização MAPK e Wnt Canônica	57
3.3.1.8. Expressão gênica em larga escala	59
3.3.1.9. Expressão de microRNAs (miRs) relacionados com o processo de osteogênese	62
3.3.2. Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os UMRs	63
3.3.2.1. Detecção e quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada	63
3.3.2.2. Detecção das proteínas ALP e OPN por Imunofluorescência	66
3.3.2.3. Detecção e quantificação das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot	67
3.4. DISCUSSÃO	68
3.5. CONCLUSÃO	71

CAPÍTULO 4 - EFEITO DO BIOS-2P NA FORMAÇÃO ÓSSEA

4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	72
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	72
4.2.1. Preparação das amostras	72
4.2.2. Determinação dos grupos experimentais	72
4.2.3. Caracterização do arcabouço de BioS-2P por microtomografia computadorizada (μ TC)	72
4.2.4. Procedimento Cirúrgico	73
4.2.5. Eutanásia e coleta do material	73
4.2.6. Análises microtomográfica e morfométrica	73
4.2.7. Análise histológica	74
4.2.8. Avaliação da capacidade osseoindutora do arcabouço de BioS-2P	74
4.2.9. Análise estatística	75
4.3. RESULTADOS	75
4.3.1. Caracterização do arcabouço de BioS-2P por μ TC	75
4.3.2. Análises microtomográfica e morfométrica	76
4.3.3. Análise histológica	78
4.3.4. Avaliação da capacidade osseoindutora do arcabouço de BioS-2P	79
4.4. DISCUSSÃO	80
4.5. CONCLUSÃO	82

CAPÍTULO 5 - EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE CTMS E OBS E O BIOS-2P NA FORMAÇÃO ÓSSEA

5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	83
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	83
5.2.1. Preparação das amostras	83
5.2.2. Determinação dos grupos experimentais	83
5.2.3. Obtenção e cultura das CTMs e OBs	83
5.2.4. Carreamento das células nos arcabouços de BioS-2P e avaliação da eficácia da incorporação	83
5.2.5. Procedimento Cirúrgico	84
Detecção <i>in vivo</i> dos OBs incorporados ao BioS-2P e implantados nos defeitos ósseos de calotas de ratos	84
5.2.7. Eutanásia e coleta do material	85
5.2.8. Análises microtomográfica e morfométrica	85
5.2.9. Análise histológica	85
5.2.10. Análise estatística	85
5.3. RESULTADOS	86
5.3.1. Avaliação da eficácia do carreamento das células nos arcabouços de BioS-2P e detecção das células no interior do arcabouço	86
5.3.2. Análises microtomográfica e morfométrica	87
5.3.3. Análise histológica	89
5.4. DISCUSSÃO	90
5.5. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	107

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado com capacidade de reparação e remodelação em condições fisiológicas. Contudo, na dependência da extensão do defeito, é necessário a reconstrução da continuidade óssea para o reestabelecimento das funções teciduais, psicossociais e da estética (Bell, Gregorie, 2009; Zaki, Zaky e Cancedda 2009). A reconstrução de defeitos ósseos causados por traumas, processos infecciosos ou patológicos e anomalias congênitas é um dos grandes desafios da Odontologia e Medicina modernas.

Dentre as alternativas de tratamento encontram-se os enxertos autógenos e os enxertos alógenos. O enxerto autógeno é o padrão ouro porque é o método mais efetivo em termos de regeneração óssea, por permitir a osteoindução, osteocondução e osteogênese na ausência de respostas imunológicas; mas apresenta como desvantagens o aumento da morbidade (pela necessidade de área doadora), a quantidade e disponibilidade de tecido limitadas e a reabsorção não previsível (Roden, 2010). Enxertos alógenos estão disponíveis em maior quantidade e são osteocondutores, mas existem relatos de transmissão de doenças e infecções bacterianas, além do aumento da incidência de respostas imunes e de não união, devido às diferenças nas características do osso entre doador e paciente (Delloye *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos tem sido amplamente estudada e se apresenta como uma terapia promissora (Matsumura *et al.*, 2003; Cancedda *et al.*, 2007; Tevlin *et al.*, 2014). A engenharia de tecidos utiliza conhecimentos da engenharia e das ciências biológicas para o desenvolvimento de tecidos artificiais, dentre eles o tecido ósseo (Langer, Vacanti, 1993; Rosa *et al.*, 2008; Langer, Vacanti, 2016). É uma ciência interdisciplinar baseada na combinação de células, fatores de crescimento e arcabouços (Langer, Vacanti, 1993; Rosa *et al.*, 2008; Langer, Vacanti, 2016), e envolve um processo dinâmico e complexo, que se inicia com a migração e recrutamento de células osteoprogenitoras do tecido adjacente ou previamente inseridas no arcabouço, seguidos de proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular mineralizada, culminando com a formação de tecido ósseo (Bose *et al.*, 2012; Amini *et al.*, 2012).

Ainda não há um consenso na literatura quanto ao tipo celular ideal. Diversos tipos celulares têm sido investigados quanto à facilidade de obtenção, isolamento e expansão e quanto à capacidade de diferenciação e expressão de marcadores ósseos, assim como, a capacidade de promover o reparo e a regeneração óssea (Amini *et al.*, 2012). As células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea são as mais comumente estudadas

e empregadas em razão da facilidade de obtenção e do potencial de diferenciação em vários tecidos, incluindo o tecido ósseo (Rosa *et al.*, 2008; Karaoz *et al.*, 2009; Barzilay *et al.*, 2009). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que osteoblastos no início do processo de diferenciação (OBs), mas não aqueles mais diferenciados, apresentam o mesmo potencial de formação óssea que as CTMs e, portanto, podem ser utilizadas para a engenharia de tecido (Beloti *et al.*, 2012).

Combinados às células, os fatores de crescimento têm sido utilizados com a finalidade de estimular o crescimento e diferenciação celular. Contudo, as pesquisas ainda são pouco conclusivas na determinação de qual(is) fator(es) são necessários, em que concentração e em qual etapa do processo de formação tecidual; assim, a incorporação de fatores de crescimento nos arcabouços não tem se mostrado uma terapia eficiente (Amini *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2016). Resultados produzidos pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram que a combinação de fatores de crescimento que mimetizariam os principais componentes encontrados no plasma rico em plaquetas, resultou em inibição da diferenciação osteoblástica (de Oliveira *et al.*, 2008; de Oliva *et al.*, 2009). Portanto, temos optado pela estratégia de não incorporar fatores de crescimento (Beloti *et al.*, 2012), e sim utilizar as células incorporadas aos arcabouços como fonte dos fatores de crescimento (Kirkpatrick, 2007).

Os arcabouços têm como função, dentre outras, carrear as células e, quando utilizados, os fatores de crescimento. Idealmente devem ser tridimensionais, biocompatíveis, mecanicamente estáveis, reabsorvíveis e porosos com poros interconectados (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005; Karageorgiou e Kaplan, 2005; Bose *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2016). O tamanho dos poros afeta a vascularização e a consequente infiltração de células e tecidos, podendo interferir no processo de reparo ósseo (Boyan *et al.*, 1996a, 1996b; Harley *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2012). Embora não haja consenso sobre o tamanho ideal dos poros, admite-se que poros maiores do que 300 μm são necessários para vascularização e crescimento ósseo (Tsuruga *et al.*, 1997; Karageorgiou, Kaplan, 2005; Roosa *et al.*, 2010), enquanto poros maiores do que 500 μm favorecem a expressão do fenótipo osteoblástico (Sicchieri *et al.*, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que arcabouços com diferentes diâmetros de poros apresentam performance favorável em termos de regeneração óssea (Woodard *et al.*, 2007; Bose *et al.*, 2012).

Vários biomateriais têm sido desenvolvidos e estudados para serem utilizados como arcabouços, como os metais, materiais orgânicos e inorgânicos, sintéticos e naturais. Os vidros bioativos surgem como uma alternativa promissora por apresentarem alta biocompatibilidade e capacidade de estimular *in vitro* a osteogênese. No final da década de 60,

o Prof. Larry Hench da Universidade da Flórida desenvolveu e patenteou um vidro bioativo chamado Bioglass®, nome comercial da composição original 45S5, composta por 46.1 mol.% SiO₂, 24.4 mol.% Na₂O, 26.9 mol.% CaO e 2.6 mol.% P₂O₅. O desenvolvimento do Bioglass® 45S5 (45S5) representou um grande salto no campo da regeneração óssea, pela sua capacidade de formar uma ponte óssea, sem a interface de um tecido conjuntivo (Hench, 1971; Hench, 2006). Desde então, centenas de estudos estão sendo realizados utilizando o 45S5 e suas variações, nas mais diversas áreas do conhecimento (Jones, 2013; Hench, 2013; Hench, 2015; Baino *et al.*, 2015).

A bioatividade do 45S5 e de suas variações é atribuída às reações de trocas iônicas ocorridas entre a superfície do material e o meio, que culminam na formação de uma camada de hidroxicarbonoapatita (HCA) e que estimulam eventos biológicos principalmente relacionados à osteogênese (Hench, 1991; Hench, 2002; Jones, 2013). Experimentos *in vitro* e *in vivo* esclareceram a dinâmica da formação da camada de HCA: logo após a exposição da superfície aos fluidos biológicos ocorre a troca iônica dos íons sódio e cálcio da superfície do vidro, com os íons hidrogênio presentes no meio, causando uma quebra da rede de sílica e resultando na formação de grupos silanóis, que repolimerizam formando uma camada de sílica gel. Sobre essa camada, íons cálcio e fosfato se depositam, formando uma camada de fosfato de cálcio amorfo que irá sofrer a incorporação dos íons hidroxila e carbonato presentes no meio circundante, formando a camada de HCA (Abdollahi *et al.*, 2013; Jones, 2013; Kaur *et al.*, 2014; Hench *et al.*, 2014). A camada de HCA favorece a adsorção de proteínas, desencadeando os processos de adesão e diferenciação celular, e de formação de matriz extracelular mineralizada (Jones, 2013; Hench *et al.*, 2014). Assim, é atribuída à camada de HCA a capacidade de formação de uma ponte óssea entre o material e o osso nativo (Hench *et al.*, 1991; Hench *et al.*, 1998; Kobuko *et al.*, 1998). Os diferentes produtos da dissolução dos vidros também irão estimular a proliferação celular, a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, a produção de matriz extracelular mineralizada e a neoformação de vasos sanguíneos (Hench *et al.*, 2000; Xynos *et al.*, 2000a; Xynos *et al.*, 2000b; Xynos *et al.*, 2001; Jell *et al.*, 2008; Hoppe *et al.*, 2011).

Essas características biológicas fazem do 45S5 o padrão ouro dentre os materiais bioativos; contudo, sua aplicação na engenharia de tecido ósseo tem sido um desafio, pois ainda é limitada à utilização de materiais particulados. A confecção de arcabouços tridimensionais porosos é geralmente acompanhada de modificações químicas necessárias para aumentar a resistência mecânica do material, o que interfere negativamente na sua biocompatibilidade (Hench, West, 1996; Abdollahi *et al.*, 2013). Diferentes métodos de

confeção de arcabouços vêm sendo descritos, mas até o momento, não há arcabouços de 45S5 comercialmente disponíveis (Sepulveda *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006; Hench, Jones, 2015).

Na tentativa de desenvolver um material com resistência mecânica adequada e mantendo a bioatividade, a equipe do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV-UFSCar) desenvolveu uma nova vitrocerâmica pertencente ao sistema quaternário chamada Biosilicato® (Patente WO 97/41079; Peitl-Filho, 1997), a partir de tratamentos térmicos que resultaram na cristalização controlada dos vidros. Estudos prévios mostraram que a presença de uma fase cristalina composta por $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ (BioS-1P) resulta em aumento das propriedades mecânicas (Peitl-Filho *et al.*, 2001), aumento da bioatividade comparado ao 45S5 (Moura *et al.*, 2007) e torna o material usinável (Crovace, 2010).

Avaliações *in vivo* evidenciaram que o BioS-1P particulado é biocompatível (Rennó *et al.*, 2013); promove respostas biológicas similares ao enxerto autógeno (Matsumoto *et al.*, 2012) e ao 45S5 (Granito *et al.*, 2009; Granito *et al.*, 2011); aumenta a resistência mecânica do defeito ósseo reparado, comparável ao 45S5 (Granito *et al.*, 2011); preserva a altura óssea alveolar e não interfere na quantidade do osso em contato com os implantes, com resultados semelhantes ao 45S5 (Roriz *et al.*, 2010; Azenha *et al.*, 2010). Ainda, tem sido atribuído ao BioS-1P uma atividade antimicrobiana, pela ausência de sinais de infecção nos sítios de implantação (Matsumoto *et al.*, 2012). A excelente performance apresentada pelo BioS-1P o torna candidato ao desenvolvimento de arcabouços para a aplicação na engenharia de tecidos. Mas, para ser confeccionado na forma de uma arcabouço tridimensional poroso, é necessário um tratamento térmico complementar que resulta em uma segunda fase cristalina composta por NaCaPO_4 (BioS-2P). A presença da fase cristalina adicional manteve as mesmas propriedades mecânicas (Crovace *et al.*, 2016) e a bioatividade (Kido *et al.*, 2013), além de ter melhorado algumas respostas biológicas como o aumento da produção de matriz extracelular mineralizada (Alves, 2012).

O conjunto de evidências acima torna o BioS-2P um candidato atraente para ser utilizado como arcabouço. No entanto, o efeito da adição da segunda fase cristalina sobre as células utilizadas na engenharia do tecido ósseo e sobre a formação do tecido ósseo precisam ser investigados.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do BioS-2P no comportamento celular *in vitro* e sobre o tecido ósseo *in vivo* com vistas à sua utilização como arcabouço na engenharia do tecido ósseo. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Caracterizar as CTMs e os OBs derivados da medula óssea de ratos, que serão utilizados nas avaliações posteriores.
2. Avaliar o potencial do BioS-2P em induzir a diferenciação osteoblástica das CTMs.
3. Avaliar o efeito do BioS-2P na morfologia, proliferação e diferenciação dos OBs e na diferenciação dos osteoblastos derivados da linhagem UMR-106.
4. Avaliar o efeito do BioS-2P no reparo de defeitos ósseos criados em calotas de ratos.
5. Avaliar o efeito da associação do BioS-2P com CTMs e OBs no reparo de defeitos ósseos criados em calotas de ratos.

CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CTMS E DOS OBS

1.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterizar as CTMs e os OBs derivados da medula óssea de ratos, que serão utilizados nas avaliações posteriores.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Obtenção e cultura das CTMs e dos OBs derivados de medula óssea de ratos

Células da medula óssea foram obtidas de fêmures de ratos Wistar, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - *Campus* de Ribeirão Preto da USP (Anexo A). Foram utilizados ratos com peso aproximado de 150g e estes foram eutanaziados com excesso dos anestésicos Ketamina (Agener União, SP, Brasil) e Xilazina (Calier, MG, Brasil).

Os fêmures foram removidos e transportados para o fluxo laminar em meio de transporte, composto por α -MEM (Gibco-Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco). As epífises dos fêmures foram removidas e a medula óssea foi coletada por lavagem do canal medular das diáfises com 10 mL de meio de expansão (ME), constituído por α -MEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 UI/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco). A medula óssea coletada foi mantida em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated, NY, EUA) contendo 20 mL de ME. Ao final de 72 h, os frascos contendo as células derivadas da medula óssea foram lavados com PBS (Gibco) para remoção de células não aderidas e seleção das CTMs, que permanecem aderidas ao poliestireno. Para expansão das CTMs, as culturas foram mantidas em ME por até 14 dias. Para obtenção dos OBs, o ME foi substituído por meio osteogênico (MO), que é o ME suplementado com 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco), β -glicerofosfato a 7 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e dexametasona a 10^{-7} M (Sigma-Aldrich) por 10 dias. Durante o período de cultivo, as garrafas foram mantidas incubadora (Sanyo Electric Co., OS, Japão) a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Esses dois tipos celulares foram caracterizados e utilizados nos experimentos *in vitro* descritos abaixo.

1.2.2. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo

Após 7 e 14 dias de cultura, as CTMs foram caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície (CD29, CD90, CD31, CD34, CD45 e CD106), analisada por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo foi realizada no aparelho FACSCanto™ (BD Biosciences, NJ, EUA). As células foram tripsinizadas (Gibco), a suspensão de células foi ajustada para a concentração de 5×10^5 células por tubo e foram incubadas separadamente, com 2 μ L dos anticorpos primários anti- CD29, CD90, CD31, CD34, CD45 e CD106 (B&D Biosystems, NJ, EUA). As incubações foram realizadas por 30 min e em ausência de luz. Em seguida, as células foram homogeneizadas em 2 mL de PBS/Tween-20 (Sigma-Aldrich) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células submetidas à lavagem com solução de PBS (Gibco). Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados às células 500 μ L de solução de formaldeído (Merck, HE, Alemanha) diluído a 1% em PBS, e os tubos foram estocados em refrigerador ao abrigo da luz, até o momento de leitura no citômetro de fluxo.

1.2.3. Caracterização dos OBs por PCR em tempo real

Após 10 dias de cultura, os OBs foram caracterizados pela expressão de genes indicativos da diferenciação osteoblástica por PCR em tempo real. Para tanto, a extração do RNA total foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, EUA) de acordo com especificações do fabricante, e o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda no equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare, LC, Reino Unido). Em seguida, foi confeccionada a fita complementar de DNA (DNAC) a partir de 1 μ g de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, HA, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems para PCR em tempo real (Invitrogen-Life Technologies, NY, EUA). As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) em aparelho CFX96 (Bio Rad, CA, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata com volume final de 10 μ L contendo 5 μ L de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 μ L das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 4,5 μ L de DNAC. A reação de amplificação foi composta por: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 15 s a 95 °C por 15 s e 1 min a 60 °C desnaturação e extensão). Os genes avaliados foram da fosfatase alcalina (ALP), runt related transcription factor 2 (RUNX2), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OC) e os resultados foram analisados com base no valor de Ct (do Inglês, cycle

threshold), 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 dos genes. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene constitutivo β -actina (ACTB), usada para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. A quantificação relativa dos genes, denominada unidades relativas de expressão (URE) foi realizada pelo método descrito por Straub *et al.* (2007) e os dados representados como diferenças (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo.

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Caracterização das CTMs por citometria de fluxo

Aos 7 e 14 dias de cultura, as CTMs derivadas da medula óssea de ratos apresentaram alta porcentagem de células expressando os marcadores CD29 e CD90, enquanto uma baixa porcentagem de células expressaram os marcadores CD31, CD34, CD45 e CD106, conforme demonstrado nos histogramas (Figura 1.1 A) e na porcentagem de células marcadas (Figura 1.1 B).

Figura 1.1. Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas a partir da medula óssea de ratos e cultivadas por 7 e 14 dias. A. Os histogramas mostram a expressão de CD29, CD90, CD31, CD34, CD45 e CD106 das CTMs. B. Os números indicam a porcentagem de CTMs marcadas..

1.3.2. Caracterização dos OBs por PCR em tempo real.

A análise por PCR em tempo real confirmou que as CTMs se diferenciaram em OBs, uma vez que todos os genes investigados (ALP, RUNX2, BSP e OC) foram expressos pelas células após 10 dias de cultivo em MO (Figura 1.2).

Figura 1.2. Expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, BSP e OC) dos osteoblastos em estágio inicial de diferenciação (OBs), derivados de medula óssea de rato, aos 10 dias de cultivo. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4).

1.4. DISCUSSÃO

Os resultados mais confiáveis são obtidos quando acompanhados das caracterizações das células. No presente estudo foram utilizadas CTMs derivadas da medula óssea e OBs derivados dessas CTMs pela indução em meio osteogênico. Previamente ao uso dessas células, realizamos sua caracterização para comprovar o uso de CTMs e OBs nas avaliações posteriores. A caracterização fenotípica das CTMs por citometria de fluxo evidenciou uma população rica em CTMs com porcentagens relativamente baixas de células hematopoiéticas; e a caracterização genotípica por PCR em tempo real dessas células mantidas em MO confirmou sua diferenciação osteoblástica.

O estroma da medula óssea é uma das fontes de células progenitoras, composto por uma população celular heterogênea, e com uma pequena quantidade de CTMs (Friedenstein *et al.*, 1974; Abdallah e Kassem, 2008; Bydlowski *et al.*, 2009). Na tentativa de se obter uma população celular homogênea e rica em CTMs, diferentes métodos de isolamento e obtenção vem sendo descritos na literatura (Zhu *et al.*, 2008; Mosna *et al.*, 2010). Esses protocolos envolvem a realização de vários processos de tripsinização e subcultivo que, ao serem aplicados às células derivadas de medula óssea de ratos, promoveu um aumento da morte celular e estagnação do processo de proliferação celular, a partir da terceira passagem (dados não mostrados). Estes resultados vão de encontro com outros estudos que evidenciaram modificação da capacidade de proliferação, da morfologia, do perfil de marcadores de superfície e da capacidade de diferenciação celular após diversas passagens (Stein, Lian, 1993; Kulterer *et al.*, 2007). A diminuição da taxa de proliferação observada pode estar relacionada com a alta densidade de plaqueamento inicial, uma vez que o contato célula-

célula ou fatores secretados no meio levam a taxas de crescimento mais baixas (Colter *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2002). Desse modo, optamos por utilizar a metodologia empregada rotineiramente em nossos laboratórios, baseada naquela desenvolvida na Universidade de Toronto (Maniopoulos *et al.*, 1988) e avaliar se ela garante uma população rica em CTMs.

Após isolamento das células da medula óssea, estas se aderiram ao poliestireno, cumprindo-se assim o primeiro critério para caracterização das CTMs estabelecido pela International Society for Cellular Therapy (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006). O segundo critério é a presença de uma população celular que expresse alta porcentagem de alguns marcadores de superfície e baixa porcentagem de outros marcadores de superfície. Esse requisito representa um desafio na caracterização das CTMs, uma vez que ainda não foram estabelecidos marcadores definidos e definitivos, e a expressão destes varia de acordo com o método de isolamento, de cultivo, grau de diferenciação celular e espécie estudada (Panepucci *et al.*, 2004; Bydlowski *et al.*, 2009). CTMs derivadas de medula óssea humana e de rato expressam os marcadores CD29 e CD90 (Karaoz *et al.*, 2009), mas não expressam os marcadores hematopoéticos CD45 e CD34 e as moléculas de adesão CD31 (Dominici *et al.*, 2006; Barzilay *et al.*, 2009; Bydlowski *et al.*, 2009; Karaoz *et al.*, 2009; Ullah *et al.*, 2015), corroborando com os nossos resultados encontrados após a expansão das CTMs por 7 e 14 dias. A expressão do marcador CD106, em células de ratos, pode variar de acordo com a espécie, linhagem e tempo experimental avaliados; estudo prévio utilizando CTMs derivadas de medula óssea de ratos Wistar evidenciou baixa porcentagem de células CD106 (Barzilay *et al.*, 2009) vindo de acordo com os nossos resultados. Portanto, as culturas obtidas nesse estudo apresentam uma população predominantemente mesenquimal e com poucas células hematopoiéticas (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006). O último critério utilizado para caracterização celular está relacionada ao seu potencial de diferenciação em várias linhagens. A metodologia descrita aqui possibilitou a diferenciação adipogênica e osteogênica das CTMs derivadas da medula óssea de ratos (Abuna *et al.*, 2016), bem como sua diferenciação condrogênica (Mackay *et al.*, 1998; Colter *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2002; Ullah *et al.*, 2015).

Essas CTMs mantidas na presença de dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico apresentaram os mesmos marcadores de superfície (dados não mostrados), indicando a origem comum, de acordo com o perfil de expressão previamente descrito (Kulterer *et al.*, 2007). Nessas condições de cultivo, as células expressaram alguns genes marcadores ósseos ALP, RUNX2, BSP e OC, que caracterizam o genótipo osteoblástico. Em estudos anteriores, observamos que essas células mantidas nessas condições de cultivo, também apresentam expressão fenotípica de osteoblastos, tais como, atividade de ALP,

expressão protéica e formação de matriz extracelular mineralizada rica em cálcio e fósforo (Rosa e Beloti, 2003; Simão *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015). Portanto, as CTMs cultivadas sob essas condições se diferenciam em osteoblastos.

1.5. CONCLUSÃO

A caracterização fenotípica evidenciou que o método para obtenção e isolamento proposto resulta em uma população rica em CTMs e, a caracterização genotípica evidenciou essas CTMs mantidas em meio osteogênico se diferenciam em OBs.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO BIOS-2P NAS CTMS

2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o potencial do BioS-2P em induzir a diferenciação osteoblástica das CTMs.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Preparação das amostras

Os discos de BioS-2P e 45S5 foram confeccionados pelo LaMaV sob supervisão do Prof. Dr. Oscar Peitl Filho. A composição e o tratamento térmico dos discos BioS-2P estão descritos na patente WO 2004/074199 (Zanotto *et al.*, 2007). Sílica de alta pureza, carbonato de cálcio, carbonato de sódio e fosfato de sódio (JT Baker) foram usados para a fabricação do BioS-2P e 45S5. Os materiais foram pesados e misturados por 30 min em garrafa de polietileno. A fusão ocorreu em temperaturas entre 1250 °C e 1380 °C por 3 h em forno elétrico (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., NJ, EUA). Posteriormente, as amostras foram colocadas em molde cilíndrico de grafite nas dimensões de 12 mm x 30 mm e submetidas à fusão a 460 °C por 5 h. Para obtenção do BioS-2P os cilindros passaram por ciclos de tratamentos térmicos para a cristalização total do material. Os cilindros foram cortados em discos de 2 mm de altura utilizando lâmina de diamante e estes foram polidos com lixa de carbeto de silício e imersos em álcool isopropílico, para evitar modificações na superfície causadas pela umidade do ar. Previamente à realização dos ensaios, os discos foram acondicionados em placas de vidro e submetidos à esterilização em estufa, a 180 °C, por 2 h.

2.2.2. Obtenção e cultura das CTMs derivadas de medula óssea de ratos.

Para os ensaios descritos a seguir, as CTMs foram obtidas como descrito no item 1.2.1. Após 7 dias de cultivo, o meio de cultura foi removido, as garrafas lavadas com PBS, e foram adicionados 9,5 mL de solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 500 µL de collagenase tipo II (4000 U, Gibco) e 500 µL de EDTA a 1 mM (Gibco). As garrafas foram mantidas em incubadora a 37 °C por 5 min para obtenção de suspensão de células. Em seguida, a tripsina foi inativada com metade do volume de ME, as células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific, PA, EUA) e foi determinado o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de BioS-2P e 45S5 previamente dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) e nos poços vazios (Controle), contendo 1,8 mL de ME. As culturas foram mantidas por 10 dias para avaliação dos

parâmetros descritos abaixo, em incubadora (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura foi trocado a cada 48h. Os efeitos do BioS-2P sobre as CTMs cultivadas em ME foram avaliados como descrito a seguir.

2.2.3. Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada em quintuplicata pelo ensaio colorimétrico de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide). Esse ensaio é dependente da redução do MTT (Sigma-Aldrich) pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, em cristais de formazan que precipita no fundo do poço, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria (Mosmann, 1983). Os discos foram transportados para poços de uma nova placa e, discos e poços Controle, foram incubados em meio de cultura contendo MTT (5 mg/mL) por 4 h. O meio foi removido e os poços foram lavados com 1 mL de PBS (Gibco) por 3 vezes. Posteriormente foi acrescentado 1 mL de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol – Merck, em 134 µL de ácido clorídrico a 0,04 N - Merck) e a placa de cultura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente (TA) por 10 min para a solubilização do precipitado. Alíquotas de 150 µL da solução de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro (µQuant, Biotek, VT, EUA). Os dados foram expressos como absorbância normalizada pela área dos poços Controle, e subtraindo-se os valores obtidos da leitura dos discos mantidos às mesmas condições, mas sem células.

2.2.4. Medida da atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada em quintuplicata através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, MG, Brasil). Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e os testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os discos foram transportados para poços de uma nova placa e, discos e poços Controle, foram incubados com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich). Ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL do lisado foram transferidos para os tubos de ensaio previamente aquecidos em banho maria a 37 °C por 2 min e os tubos foram mantidos no banho por mais 10 min. Após esse período foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas

de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro (μ Quant). 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 pela área dos poços Controle, e expressa como μ mol de timolftaleína/h/mg de proteína.

2.2.5. Detecção e quantificação da atividade de ALP *in situ*

A atividade de ALP *in situ* foi avaliada em quintuplicata. O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com Solução de Hank's (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) aquecida a 37 °C. Os discos foram transportados para poços de uma nova placa e, discos e poços Controle, foram incubados com 1 mL de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) a 120 mM contendo (1) Fast Red TR (Sigma-Aldrich) a 1,8 mM, (2) naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) a 0,9 mM e (3) dimetilformamida (Merck), por 30 min, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os poços contendo os discos e os Controles foram lavados com PBS e fotografados por câmera fotográfica digital (Nikon, TO, Japão). As imagens adquiridas foram processadas utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

A análise quantitativa foi realizada de acordo com o método desenvolvido no nosso laboratório. Resumidamente, foram adicionados em cada poço contendo os discos e nos Controles, 250 μ L de solução de lauril sulfato de sódio 10% (Sigma-Aldrich), e as placas foram mantidas em TA sob agitação por 30 min. Após esse período, as soluções foram homogeneizadas, transferidas para tubos de 1,5 mL e submetidas à sonicação (Misonix, EUA; 2 pulsos na intensidade 10 por 20s). As soluções foram centrifugadas a 10.500 rpm por 20 min (Fischer Scientific); posteriormente, 150 μ L do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro (μ Quant). Os dados foram expressos como absorbância normalizada pela área dos poços Controle e subtraindo-se os valores obtidos da leitura dos discos mantidos às mesmas condições, mas sem células.

2.2.6. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

Os discos foram transportados para poços de uma nova placa e, discos e poços Controle foram submetidos ao protocolo de extração e quantificação do RNA total previamente descrito. A expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica foi avaliada em quadruplicata por PCR em tempo real, conforme descrito no item 1.2.3. Posteriormente, a integridade do RNA de cada amostra foi avaliada utilizando um chip que permite a avaliação

de amostras de RNA na concentração de 25 a 500 ng/ μ L, no equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Brevemente, as amostras do RNA total foram aliquotadas na concentração desejada, aquecidas a 70 °C por 2 min e mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. A matriz do gel aplicada nos capilares do chip contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador de tamanho e ao RNA resulta na emissão de fluorescência, que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico 18S e 28S e a verificação da integridade do RNA total a partir da atribuição de um número de integridade do RNA (RNA Integrity Number - RIN) que varia de 1 a 10.

Os genes avaliados foram: ALP, RUNX2, osterix (OSX), proteína óssea morfogenética -4 (BMP-4), osteopontina (OPN) e OC. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene constitutivo ACTB, usada para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), e os dados representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo e relativos à expressão dos genes das CTMs crescidas sobre o Controle.

2.2.7. Análise estatística

Todos os dados foram comparados utilizando a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Proliferação celular

Aos 10 dias de cultivo, a proliferação das CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P foi menor quando comparada à proliferação das células crescidas sobre o Controle e discos de 45S5 (Kruskal-Wallis, $p=0,039$), dentre os quais não foram detectados diferenças estatisticamente significantes. Os dados estão representados na Figura 2.1.

Figura 2.1. Proliferação das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

2.3.2. Medida da Atividade de ALP

Aos 10 dias de cultivo, a atividade de ALP foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de 45S5 em relação àquelas crescidas sobre os discos de BioS-2P, que por sua vez foi maior que CTMs crescidas sobre o Controle (Kruskal-Wallis, $p=0,002$). Os dados estão representados na Figura 2.2.

Figura 2.2. Atividade de fosfatase alcalina das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

2.3.3. Detecção e quantificação da atividade de ALP *in situ*

As imagens da atividade de ALP *in situ* aos 10 dias de cultivo sugerem que parte das CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 destacaram-se da superfície; contudo, é possível notar o aumento da intensidade da marcação dessas células em relação àquelas crescidas sobre o Controle, notadamente o 45S5. A atividade da ALP *in situ* das CTMs crescidas sobre os discos de 45S5 foi maior em relação ao Controle e discos de BioS-2P; e entre estas atividade de ALP *in situ* foi maior nas CTMs crescidas sobre o Controle em relação aos discos de BioS-2P (Kruskal-Wallis, $p=0,006$). Os dados estão representados na Figura 2.3.

Figura 2.3. Aspectos macroscópicos e quantificação da atividade de fosfatase alcalina *in situ* das culturas das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias, coradas por Fast Red. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

2.3.4. Avaliação da integridade do RNA total

Os resultados qualitativos observados nos eletroferogramas e nos respectivos géis, e os dados quantitativos detectados pelo RIN (todos acima de 9), indicaram que o RNA total das CTMs crescidas sobre o Controle e discos de 45S5 e de BioS-2P encontram-se íntegros (Figura 2.4).

Figura 2.4. Avaliação da integridade do RNA total das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os picos identificados nos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (RNA Integrity Number) representam a qualidade das amostras de RNA total.

2.3.5. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

A expressão relativa dos genes avaliados foi afetada pelas superfícies após 10 dias de cultivo e, de uma maneira geral, as CTMs apresentaram a expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica aumentada quando crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle, indicando que essas superfícies são capazes de promover a diferenciação osteoblástica das CTMs.

A expressão da ALP foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão da ALP foi maior nas CTMs

crescidas sobre o BioS-2P comparado ao 45S5 (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). A expressão do RUNX2 foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão do RUNX2 foi maior nas CTMs crescidas sobre o 45S5 comparado ao BioS-2P (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). A expressão do OSX foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão do OSX foi maior nas CTMs crescidas sobre o BioS-2P comparado ao 45S5 (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). A expressão de BMP-4 foi maior nas CTMs crescidas sobre discos de BioS-2P em relação ao 45S5 e o Controle, dentre os quais não foi detectado diferença estatisticamente significativa (Kruskal Wallis; $p = 0,005$). A expressão da OPN foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão da OPN foi maior nas CTMs crescidas sobre o 45S5 comparado ao BioS-2P (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). A expressão da OC foi maior nas CTMs crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão da OC foi maior nas CTMs crescidas sobre o 45S5 comparado ao BioS-2P (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). Os resultados estão representados na Figura 2.5.

Figura 2.5. Expressão relativa dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC) das células-tronco mesenquimais (CTMs) crescidas sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes das CTMs crescidas sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

2.4. DISCUSSÃO

Células indiferenciadas cultivadas em meio não osteogênico e crescidas sobre discos de BioS-2P e 45S5 desenvolveram fenótipo e genótipo osteoblástico, evidenciado pelo aumento da atividade enzimática da ALP e pela expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica, quando comparadas às mesmas células mantidas nas mesmas condições e crescidas sobre o plástico (Controle). Esses resultados indicam que tanto BioS-2P como 45S5 são capazes de induzir *in vitro* a diferenciação osteoblástica de CTMs.

O potencial proliferativo das CTMs nos períodos iniciais da cultura é um importante fator para a osteogênese e ele tende a aumentar quando as células são cultivadas sobre os vidros bioativos (Mesenguer-Olmos *et al.*, 2008; Ajita *et al.*, 2015). No entanto, o presente estudo evidenciou uma menor quantidade de células sobre o BioS-2P em relação ao 45S5 e ao Controle. A adesão e proliferação celular são processos dinâmicos e dependentes de uma série de fatores como características físico-química da superfície, condições de cultivo, estágio de diferenciação celular, entre outros (Tang *et al.*, 2016). Duas explicações são possíveis para a redução na proliferação celular causada pelo BioS-2P. Aos 10 dias de cultura pode ter havido o destacamento das células cultivadas sobre o BioS-2P, como observado para os experimentos da atividade de ALP *in situ*, o que também explicaria a aparente menor atividade da ALP *in situ* encontrada nesse experimento. Por outro lado, também foi observada a diferenciação osteoblástica das CTMs crescidas sobre BioS-2P e uma relação inversa entre proliferação e diferenciação tem sido descrita (Rosa e Beloti, 2003; Ojansivu *et al.*, 2015).

O potencial osteoindutor do BioS-2P é comprovado pelo aumento da atividade enzimática da ALP, um importante marcador do início da diferenciação osteoblástica e fundamental no processo de mineralização, disponibilizando o fosfato para a produção da matriz (Millán, 2014). Em relação ao controle, o BioS-2P induziu aumento da expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica ALP, RUNX2, OSX, OPN e OC. O RUNX2 é o principal fator de transcrição que regula a formação óssea (Komori *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 2010); o OSX é outro fator de transcrição imprescindível para a diferenciação osteoblástica, contribuindo para a maturação dos osteoblastos (Nakashima *et al.*, 2002); a OPN é uma das proteínas da matriz não colágena envolvidas na nucleação de cristais de hidroxiapatita (Sodek *et al.*, 2000) e a OC corresponde à 20% das proteínas não colágenas da matriz óssea, produzida por OBs previamente à mineralização e portanto considerada como um marcador tardio de diferenciação osteoblástica (Anselme, 2000).

A diferenciação celular pode ser controlada e mediada pela presença de suplementos ou de um substrato. A diferenciação osteoblástica das CTMs é induzida pela adição de ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona ao meio de cultura (Maniatopoulos *et al.*, 1988), mas esses resultados mostraram que BioS-2P e 45S5 são substratos capazes de induzir a diferenciação osteoblástica de CTMs na ausência desses suplementos. Tais observações corroboram estudos prévios com o 45S5 (Gough *et al.*, 2004; Bosetti e Cannas 2005; Reilly *et al.*, 2007; Ojansivu *et al.*, 2015), mas constituem-se na primeira evidência desse potencial para o BioS-2P. Esse processo tem sido atribuído às reações iniciais da superfície ao entrar em contato com o meio e aos produtos da dissolução iônica desta (Xynos *et al.*, 2000a; Xynos *et al.*, 2001; Hench *et al.*, 2004; Hoppe *et al.*, 2011). Modificações no pH e o aumento da concentração de cálcio, fósforo e sílica tem sido relacionados com a ativação de enzimas intracelulares e modificações de algumas vias de sinalização (Meseguer-Olmos *et al.*, 2008). Provavelmente, essas reações de superfície também participam da diferenciação induzida pelo BioS-2P uma vez que elas ocorrem nas vitrocerâmicas utilizadas para a sua confecção, o Biosilicato® com uma fase cristalina (Moura *et al.*, 2007).

Assim, a diferenciação das CTMs em OBs fica evidente nos resultados apresentados, corroborando estudos prévios que mostraram que o 45S5 é capaz de induzir a diferenciação celular (Reilly *et al.*, 2007) e confirmando que o BioS-2P, semelhante ao padrão ouro, também tem características osteoindutoras. Mas o mecanismo exato pelo qual essas superfícies induzem a diferenciação *in vitro* de CTMs em OBs ainda precisa ser investigado.

2.5. CONCLUSÃO

O BioS-2P é capaz de induzir, *in vitro*, a diferenciação osteoblástica de CTMs em condições não-osteogênicas.

CAPÍTULO 3 - EFEITO DO BIOS-2P NOS OBS E UMRs

3.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito do BioS-2P na morfologia, proliferação e diferenciação dos OBs e na diferenciação dos UMRs.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Preparação das amostras

Os discos de BioS-2P e 45S5 foram obtidos como descrito no item 2.2.1.

3.2.2. Obtenção e cultura dos OBs derivados de CTMs

Para os ensaios descritos a seguir, os OBs foram obtidos como descrito no item 1.2.1., mas cultivados por 7 dias. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as garrafas lavadas com PBS, e foram adicionados 9,5 mL de solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 500 µL de colagenase tipo II (4000 U, Gibco) e 500 µL de EDTA a 1 mM (Gibco). As garrafas foram mantidas em incubadora a 37 °C por até 10 min para obtenção de suspensão de células. Em seguida, a tripsina foi inativada com metade do volume de MO, as células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific, PA, EUA) e foi determinado o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de BioS-2P e 45S5, previamente dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) e nos poços vazios ou lamínulas de plástico –Thermanox (Nunc, NY, EUA) (Controle), contendo 1,8 mL de MO. As culturas foram mantidas por 24 h, 3 e 5 dias para avaliação da morfologia celular e por 10 dias para todos os outros parâmetros descritos abaixo. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas em incubadora (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 48h.

3.2.3. Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os OBs

Para avaliar os efeitos do BioS-2P sobre os OBs foram utilizados os seguintes ensaios:

3.2.3.1 Morfologia celular por fluorescência direta

Para avaliação da morfologia celular, os OBs cultivados sobre os discos de BioS-2P, 45S5 e o Controle por 24 h, 3 e 5 dias, foram fixados em solução de paraformaldeído 4%

(Labsynth, SP, Brasil) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à TA. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (Acros Organics, NY, EUA) 0,5% em PB, durante 10 min. Para visualização das membranas e núcleos celulares foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EUA) 1:200, e 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Após montagem da lamínula de vidro (Fisherbrand, PA, EUA) sobre os discos e o Controle, com meio de montagem anti-fade Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) nas objetivas de 20x, acoplado a uma câmara fotográfica digital AxionCam MRm (Zeiss). As imagens foram sobrepostas e analisadas utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

3.2.3.2. Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada em quintuplicata pelo ensaio colorimétrico de MTT, como descrito no item 2.2.3.

3.2.3.3. Medida da atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada em quintuplicata, como descrito no item 2.2.4.

3.2.3.4. Deteção e quantificação da atividade de ALP *in situ*

A atividade de ALP *in situ* foi avaliada em quintuplicata, como descrito no item 2.2.5.

3.2.3.5. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

A expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica foi avaliada em quadruplicata, como descrito no item 1.2.3., e integridade do RNA total foi avaliada como descrito no item 2.2.6. Os genes avaliados foram: ALP, RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene constitutivo ACTB, usado para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), e os dados representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo e relativos à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle.

3.2.3.6. Expressão de genes das vias de sinalização MAPK e Wnt Canônica

Esses ensaios foram realizados no laboratório de Epigenética da Faculdade de Odontologia da Universidade do Alabama em Birmingham sob supervisão do Prof. Dr. Mohammad Hassan. O RNA total foi extraído dos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P,

45S5 e o Controle, as amostras foram concentradas, armazenadas em solução contendo álcool 70% e enviadas para os EUA para a realização das análises. Para a via de sinalização MAPK foi avaliada a expressão dos genes: Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK-1/ERK-2); Mitogen- activated protein kinase 3 (MAPK-3/ERK-1); Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK-8/JNK); Mitogen-activated protein kinase -14 (MAPK-14/p-38). Para a via de sinalização Wnt Canônica, foi avaliada a expressão dos genes: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LPR-5); Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP-1); Axin-1, Glycogen synthase kinase 3 Beta (GSK3-β); Catenin Cadherin-Associated Protein Beta 1 (CTNNβ-1); Integrin-Linked Kinase (ILK); Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 1 (DKK-1) e Sclerostin (SOST). Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer designing tool (Tabela 3.1).

As amostras foram recuperadas por centrifugação e o RNA total foi extraído utilizando o Trizol (Invitrogen) de acordo com especificações do fabricante; após tratamento com DNase (Invitrogen), o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda no equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare). Em seguida foi confeccionada a fita de DNAc a partir de 500 ng de RNA total por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf). Para realização do PCR em tempo real foi utilizado o sistema SYBR Green (Applied Biosystems), no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Foi preparado um mix onde foram utilizados 7 µL do reagente Fast SYBR Green Master Mix que contém o fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase, dNTPs e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão e 0,5 µL da solução contendo cada primer (forward e reverse – Tabela 3.1) com as concentrações adequadas, somando 8 µL. Foi preparado 2,5 µL da solução de DNAc com 2,5 µL de água deionizada autoclavada, totalizando 5 µL. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 8 µL do mix e 5 µL da solução de DNAc, em triplicata, para cada primer selecionado. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, além de um ciclo final de 20 min, com temperatura crescente de 60 °C a 95 °C, empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, do inglês cycle threshold). A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), e os dados representados como diferença

(em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo ACTB e relativos à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle.

Tabela 3.1. Sequência de nucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes relacionados com as vias MAPK e Wnt Canônica.

Gene	Primers forward e reverse	pb
ACTB	GCAGGAGTACGATGAGTCC ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	74
MAPK-1	TCCAGCCAGGATACAGATCTTAAA GGGGACACCGACATCTGAAC	77
MAPK-3	AACCCAAACAAGCGCATCAC AGCCACTGGTTCATCTGTCTG	87
MAPK-8	CTGCAATACCCAGGCACCTT TTCCTACAACCCTGCAGCTC	98
MAPK-14	TAATGCGTCTGACGGGGACA TGGGCCAGAGACTGAATGTAG	88
LPR-5	CCATTGTGTTGCACCCTGTG GCCCATCTAGGTTGGCACAT	87
SFRP-1	ATCGGAGGCCATCATCGAAC TGGGGACAATCTCTTGACAC	98
AXIN-1	ATCAGTAGACACCGGAAGGC GACGTTCAATGGACAAGGGC	91
GSK3- β	CCTCAGCTCGGATTCAGG ATTGGTCTGTCCACGGTCTC	90
CTNN β -1	CTTATCCCTCCTCAGCTCG CCTGTGGCTTGTCTCAGAC	88
ILK	TCGGCCTACTATCCCACCAG TCAAACCTGGGTCGCTTTGC	93
DKK-1	TTCCCTAAGTGACCGACAGT GTTGGTGGGTTTCCTTCCACA	96
SOST	AGAACAACCAGACCATGAACCG GCAGCTGTACTCGGACACG	89

β -Actina (ACTB); Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK-1); Mitogen- activated protein kinase 3 (MAPK-3); Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK-8); Mitogen-activated protein kinase -14 (MAPK-14); Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LPR-5); Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP-1); Axin-1, Glycogen synthase kinase 3 Beta (GSK3- β); Catenin Cadherin-Associated Protein Beta 1 (CTNN β -1); Integrin-Linked Kinase (ILK); Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 1 (DKK-1) e Sclerostin (SOST).

Pb: indica o número de pares de bases

3.2.3.7. Expressão gênica em larga escala

Esses ensaios foram realizados no Laboratório Heflin Center for Genomic Science Core, da Universidade do Alabama em Birmingham e sob supervisão do Prof. Dr. Mohammad Hassan. Para tanto, foram utilizadas as amostras de RNA obtidas como descrito no item 3.2.3.6. Após recuperação das amostras por centrifugação, as amostras de RNA total foram concentradas (5 μ g) e submetidas ao sequenciamento, realizado na plataforma Illumina HiSeq (Illumina, CA, EUA), com as versões mais recentes dos reagentes de sequenciamento e superfícies de clonagem, fornecendo até 300 GB em informações de sequenciamento por superfície de clonagem e totalizando mais de 23.000 genes sequenciados. A qualidade do RNA total foi avaliada utilizando o Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent), seguida da confecção de

fitas de DNAC. Para a geração das bibliotecas, foram utilizados kits TruSeq (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. As extremidades do DNAC foram reparadas e foram adicionados a cauda poli-A e os adaptadores para indexação (até 12 diferentes códigos de barras diferentes por faixa) durante os ciclos de sequenciamento. Os clusters foram gerados para render aproximadamente 725K-825K clusters/mm². Sua densidade e qualidade foram determinadas durante a corrida, após a avaliação dos parâmetros de adição da primeira base.

Foram realizadas corridas de sequenciamento de emparelhamento final 2x50 pares de base (pb) para alinhar as sequências de DNAC para o genoma de referência. Previamente ao alinhamento, os dados foram convertidos para o formato FASTQ Sanger pelo programa FASTQ Groomer. O programa TopHat foi utilizado para alinhar as leituras com o genoma de referência, utilizando o programa Bowtie para alinhamento de sequências curtas, e para analisar os resultados do mapeamento, pela identificação de junções de splicing entre os exons. As leituras alinhadas foram utilizadas para a montagem de transcritos, estimativa de abundância e testes de expressão e regulação diferenciais. A ferramenta Cuffcompare comparou os transcritos montados com a anotação de referência e rastreou transcrições ao longo de vários experimentos. Por fim, o Cuffdiff indicou alterações significantes na expressão de transcritos de mRNAs. O arquivo BAM gerado pelo TopHat foi filtrado e a leitura foi pareada e mapeada. Para apresentação dos resultados, foram selecionados as expressões diferenciais apenas dos genes expressos com diferenças estatisticamente significante. As análises estatísticas foram realizadas por ferramentas de bioinformática.

Os resultados da análise de sequenciamento foram validados no Brasil, pela expressão de genes comumente sobre-expressos ou reprimidos pelos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5, em relação ao controle. A avaliação foi feita por PCR em tempo real, como descrito no 1.2.3. Os genes selecionados foram: DMP-1 (Dentin matrix acidic phosphoprotein 1), PHOSPHO-1 (phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase 1), RCOR-2 (REST Corepressor 2) e MYH-11 (Myosin, Heavy Chain 11). Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, do inglês cycle threshold). A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), e os dados representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo ACTB e relativos à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle.

3.2.3.8. Expressão de microRNAs (miRs) relacionados com o processo de osteogênese

Esses ensaios foram realizados no laboratório de Epigenética da Faculdade de Odontologia da Universidade do Alabama em Birmingham sob supervisão do Prof. Dr. Mohammad Hassan. Para tanto, foram utilizadas as amostras de RNA cuja obtenção e procedimentos de extração, confecção da fita de DNAc e realização do PCR por tempo real foram descritos no item 3.2.3.6. Foi avaliada a expressão dos miRs relacionados ao processo de osteogênese: miR -29b, -30c, -34a, -125, -133, -146a, -206, -210. Os miRs foram desenhados utilizando o programa Primer designing tool (Tabela 3.2). Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, do inglês cycle threshold). A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), e os dados representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo constitutivo small nuclear RNA (snRNA) U6 e relativos à expressão dos miRs dos OBs crescidos sobre o Controle.

Tabela 3.2. Sequência de nucleotídeos utilizados para a amplificação dos miRs.

microRNAs	Sequência forward e reverse	pb
U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC CAGGGGCCATGCTAATCTT	17
29b	CACATGGTGGCTTAGATTTTCCAT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	25
30c	AGTAAGAAAGCTGGGAGAAGGCT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	23
34a	GTGTCTTAGCTGGTTGTTGTGAGT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	24
125	CGTTTAAATCCACGGTTAGGCT GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	23
133	TGGATTGTTGGTCCCCTCAACCA GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	22
146a	TGTGAAGTTCAGTTCTTAGCTGGG GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	25
206	CCCAGGCCACATGCTTCTTTA GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	21
210	CTGTGCGTGTGACAGCGG GACGAGGACTCGAGCTCAAGCT	18

pb: indica o número de pares de bases.

3.2.4. Obtenção e cultura dos UMRs

Osteoblastos derivados de ratos da linhagem UMR-106 (ATCC®, VA, EUA) (UMRs), mantidos em estoque no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram descongelados e transferidos para tubos de centrifuga contendo 10 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado

com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 UI/mL de penicilina (Invitrogen) e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e centrifugados a 2000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi desprezado e as células cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (Corning) contendo o mesmo meio de cultura. Na subconfluência, o meio de cultura foi removido, e foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção da suspensão de células. As células foram contadas no hemocitômetro (Fisher) e foi determinado o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 2×10^4 células/poço sobre os discos de BioS-2P e 45S5 previamente dispostos em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) e nos poços vazios ou Thermanox (Controle), contendo 1,5 mL do meio osteogênico composto de DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco) e beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich). Durante o tempo de cultivo as células foram mantidas em incubadora (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico; o meio de cultura foi trocado a cada 48h e as análises foram realizadas aos 5 dias de cultivo.

3.2.5 Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os UMRs

Para avaliar os efeitos do BioS-2P sobre os UMRs, foram utilizados os seguintes ensaios:

3.2.5.1. Deteção e quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada

Após a remoção do meio de cultura, os discos e o Controle foram processados para coloração utilizando o método de Von Kossa que detecta depósitos de fosfato de cálcio da matriz (McGee-Russel, 1958). Brevemente, após lavagem e fixação com glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 10 min, os discos e o Controle foram cobertos por nitrato de prata 1% e submetidos à exposição solar por 1h. Após esse período, os discos e o Controle foram lavados com água destilada, e imersos em solução de tiosulfato de sódio 5% por 2 min. Os depósitos de fosfato de cálcio reagem com o nitrato de prata e dão origem a fosfato de prata, que é reduzido pela luz, formando prata metálica, identificada como pontos negros na camada celular. Os poços contendo os discos e Controles foram fotografados por câmera fotográfica acoplada ao microscópio de fase invertido (Zeiss) e as imagens adquiridas foram processadas utilizando o software LeicaQuin; foi determinado a área de cada superfície e a quantificação da matriz mineralizada foi realizada a partir da contagem de pixels, normalizada pela área do Controle.

A preparação dos discos e as análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar. Discos de BioS-2P e 45S5 submetidos ao cultivo com e sem UMRs foram utilizados para análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o microscópio modelo XL-30 FEG (Philips, OR, EUA) operando em 25Kv. Os discos foram fixados com solução de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0.1 M, desidratados e levados ao ponto crítico para secagem. Em seguida, os discos foram levados ao metalizador para impregnação com ouro. Foram selecionadas áreas que continhas nódulos nas superfícies cultivadas com e sem células, e as imagens foram capturadas utilizando aumentos variando de 500x a 20.000x.

3.2.5.2. Detecção das proteínas ALP e OPN por Imunofluorescência

Após a remoção do meio de cultura, os discos e o Controle foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (Labsynth) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à TA. A permeabilização foi realizada com solução de Triton X-100 (Acros Organics) 0,5% em PB, durante 10 min, seguido do bloqueio com leite (Bio-Rad) 5% em PB por 30min. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais para ALP (monoclonal de camundongo, B4-78, 1:100, DSHB) e OPN (monoclonal de camundongo, 1:200, MPIIB10, DSHB) seguido da incubação com Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha) conjugado com anticorpo secundário (cabra-anti camundongo, 1:200, Molecular Probes, Invitrogen, OR, EUA). Para visualização das membranas e núcleos celulares foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes) e 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Após montagem de lâmina de vidro (Fisherbrand, PA, EUA) sobre os discos e o Controle, com meio de montagem anti-fade Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) na objetiva de 20x, acoplado a uma câmara fotográfica digital AxionCam MRm (Zeiss). As imagens foram sobrepostas e analisadas utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

3.2.5.3. Detecção e quantificação das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot

Após a remoção do meio de cultura, as células foram tripsinizadas, lavadas 3 vezes com PBS e o pellet de células lisado em 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) e em ultrassom (Misonix, EUA; 5 pulsos na intensidade 10 por 10 s, com intervalo de 1 min entre cada pulso). A proteína total foi quantificada pelo método descrito por

Lowry *et al.* (1951). Foram preparados géis de acrilamida a 8,5% (para um volume final de 10 mL - 2,84 mL de acrilamida, 2,6 mL de tampão Tris a 1,5% e SDS a 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 mL de Temed e 75 mL de persulfato de amônio a 10%, National Diagnostics, EUA), montados em aparato próprio e adicionado tampão de corrida 1X (3,01 g de Tris base, Roche; 14,4 g de glicina, USB Corporation, EUA; e 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; para um volume final de 1 L de água destilada). Amostras contendo 50 µg de proteína em 20 µL foram misturadas com 5 µL de Dye 6X (7 mL de Tris base pH 6,8, Roche; 3 mL de glicerol, Sigma-Aldrich; 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; 0,93 g de DTT, Sigma-Aldrich; 1,2 mg de bromofenol, Sigma-Aldrich em um volume final de 10 mL de água destilada) e mantidas em banho com água em ebulição por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.500 rpm e aplicadas nos géis. A separação das proteínas foi feita com o aparato em 100 Volts por aproximadamente 1 h. Para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um marcador (Bio-Rad) que identifica bandas entre 10 e 250 kDa. As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Thermo Scientific, EUA), usando aparato adequado (Bio-Rad), com voltagem variável e amperagem fixa em 10 A por 45 min. As membranas foram incubadas em solução de leite desnatado a 5% em TBS-Tween (2,43 g de Tris- Roche; 8 g de NaCl-Sigma-Aldrich e 1 mL de Tween 20 em um volume final de 1 L de água destilada, pH 7,6) à TA por 1 h, para bloqueio de sítios inespecíficos. Foi realizado incubação com os anticorpos primários por 2 h: anti-RUNX2 (monoclonal de coelho, 1:1000, Cell Signaling-D1H7), anti-ALP (monoclonal de camundongo, 1:2000, Santa Cruz - sc137213), anti-DMP-1 (policlonal de coelho, 1:1000, Biovision- 384-1000), anti-OC (monoclonal de camundongo, 1:2000, Abcam-OC4-30). Posteriormente foi realizado a incubação dos anticorpos secundários por 40 min: RUNX2 (cabra anti-coelho IgG1, 1:3000, Sigma-A0545), ALP (cabra anti-camundongo IgG1, 1:2000; Santa Cruz- sc2060), DMP-1 (cabra anti-coelho 1:3000 Santa Cruz - SC2030), OC (cabra anti-camundongo IgG1, 1:2000; Santa Cruz- sc2060). Entre cada incubação as membranas foram lavadas três vezes, por 10 min, com TBS-T. Ao término da última lavagem as membranas foram incubadas por 1 min em solução quimioluminescente (Perkin Elmer, EUA) e analisadas no aparelho G-Box (Syngene, EUA) que detecta a luminescência das bandas marcadas referentes às proteínas de interesse (RUNX2 - 62 kDa; ALP - 80 kDa; DMP1 - 90 kDa; SPP1 - 12 kDa; GAPDH - 37 kDa). Ao final do processo, as membranas foram incubadas em solução Re-blot plus mild (Millipore, EUA), à TA por 20 min, para a remoção dos anticorpos primário e secundário e submetidas ao mesmo processo descrito, usando anticorpo primário anti-GADPH (monoclonal de coelho, 1:1000, Santa Cruz - sc25778), e anticorpo secundário (cabra anti-coelho IgG1, 1:3000, Sigma-

A0545). A expressão das proteínas selecionadas foram quantificadas utilizando o software de imagens Image J (Schneider *et al.*, 2012), normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH e relativos à expressão das proteínas dos UMRs crescidos sobre o Controle.

3.2.6 Análise estatística

Todos os dados quantificáveis (com exceção do sequenciamento) foram comparados utilizando a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student Newman-Keuls e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os OBs

3.3.1.1. Morfologia celular por fluorescência direta

Ao final de 24 h, os OBs estavam aderidos sobre os discos de BioS-2P e de 45S5 e sobre o Controle, e as células cultivadas sobre o BioS-2P apresentavam sinais de maior espreadimento, quando comparadas às células cultivadas sobre o Controle e 45S5 (Comparar Figura 3.1 A-B com C). Após 3 dias, os OBs encontravam-se com formato alongado e emitindo projeções citoplasmáticas, distribuídos uniformemente por toda a superfície Controle e 45S5, enquanto no BioS-2P os OBs encontram-se menos espreados; ainda é possível notar maior densidade celular dos OBs crescidos sobre o Controle e 45S5 em relação ao Bio-2P (Comparar Figura 3.1 D-E com F). Aos 5 dias, os OBs crescidos sobre todas as superfícies atingiram confluência e a presença de multicamadas celulares foi observada (Figura 3.1 G, H e I).

As imagens das células crescidas sobre os discos de BioS-2P e 45S5, nos 3 períodos avaliados, evidenciaram a perda dos limites celulares com a ausência de sinais de fluorescência, assemelhando-se a estruturas esféricas no interior/acima dos filamentos de actina e dos núcleos (Figura 3.1. B, C, E, F, H e I, indicado pelas cabeças de setas).

Figura 3.1. Morfologia dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 24 h (A-C), 3 dias (D-F) e 5 dias (G-I) sobre o Thermanox (Controle) (A,D,G), discos de 45S5 (B,E,H) e discos de BioS-2P (C-F-I). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI). Aumento de 20x. Barra: 100 μ m.

3.3.1.2. Proliferação celular

Aos 10 dias de cultivo, foi detectado menor quantidade de OBs sobre os discos de BioS-2P e 45S5 comparado ao Controle e, entre os discos, a quantidade de OBs é maior no BioS-2P em relação ao 45S5 (Kruskal Wallis; $p=0,002$). Os resultados estão representados na Figura 3.2.

Figura 3.2. Proliferação dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

3.3.1.3. Medida da atividade de ALP

Aos 10 dias de cultivo, a atividade de ALP foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, não houve diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis; $p=0,005$). Os resultados estão representados na Figura 3.3.

Figura 3.3. Atividade de fosfatase alcalina dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

3.3.1.4. Detecção e quantificação da atividade de ALP *in situ*

As imagens da atividade de ALP *in situ* aos 10 dias de cultivo, sugerem um aumento da marcação dos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle. A quantificação confirma o aumento da atividade de ALP *in situ* nos OBs crescidos sobre os discos de 45S5 e BioS-2P em relação ao Controle e, entre os discos, a atividade de ALP *in situ* é maior nos OBs crescidos sobre o 45S5 comparado ao BioS-2P (Kruskal-Wallis, $p=0,002$). Os dados estão representados na Figura 3.4.

Figura 3.4. Aspectos macroscópicos e quantificação da atividade de fosfatase alcalina *in situ* das culturas dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs), sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias, e corados por Fast Red. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

3.3.1.5. Avaliação da integridade do RNA total

Os resultados qualitativos observados nos eletroferogramas e nos respectivos géis, e os dados quantitativos detectados pelo RIN (todos acima de 9), indicaram que o RNA total dos OBs crescidos sobre o Controle e discos de 45S5 e de BioS-2P encontram-se íntegros (Figura 3.5).

Figura 3.5. Avaliação da integridade do RNA total dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os picos identificados nos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (*RNA Integrity Number*) representam a qualidade das amostras de RNA total.

3.3.1.6. Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

A expressão relativa dos genes avaliados foi afetada pelas superfícies após 10 dias de cultivo, e, de uma maneira geral, os OBs apresentaram um aumento da expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica quando crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle.

A expressão de ALP foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de 45S5 relação ao Controle e este maior que a expressão de ALP nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P (Kruskal Wallis; $p < 0,001$). As expressões de RUNX2, OSX, OPN e OC foram maiores nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e de 45S5 em relação ao Controle; e, entre os discos, as expressões desses genes foram maiores nos OBs crescidos sobre o 45S5 comparado ao BioS-2P (Kruskal Wallis; $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,011$ e $p < 0,001$, respectivamente). A expressão de BMP-4 foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e de 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos não houve diferença estatisticamente significativa (Kruskal Wallis; $p = 0,007$). Os resultados estão representados na Figura 3.6.

Figura 3.6. Expressão relativa dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica (ALP, RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

3.3.1.7 Expressão de genes da via de sinalização MAPK e Wnt Canônica

Aos 10 dias de cultivo, a expressão relativa dos genes relacionados às vias das MAPK foi afetada pelas superfícies. A expressão do MAPK-1 foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de 45S5 em relação aos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e o Controle, dentre os quais não houve diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis, $p=0,007$). A expressão do MAPK-3 foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, a expressão do MAPK-3 foi maior nos OBs crescidos sobre o 45S5 comparado com o BioS-2P (Kruskal-Wallis, $p<0,001$). A expressão do MAPK-8 foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle e, entre os discos, não foi detectado diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p=0,015$). A expressão do MAPK-14 foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de 45S5 em relação aos OBs crescidos sobre discos de BioS-2P e o Controle, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, $p=0,001$). Os dados estão representados na Figura 3.7.

Figura 3.7. Expressão relativa dos genes envolvidos na via de sinalização MAPK (MAPK-1; MAPK-3; MAPK-8; MAPK-14) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$)

A expressão relativa dos genes relacionados com a via de sinalização Wnt Canônica estão aumentados nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle, indicando que estas superfícies podem ativar esta via (Kruskal-Wallis: LPR-5= $p < 0,001$; SPFR-1= $p < 0,001$; AXIN-1= $p < 0,001$; GSK3- β = $p = 0,005$; β -CATENINA= $p < 0,001$; ILK= $p < 0,001$; DKK1= $p = 0,005$ e SOST= $p = 0,002$). A expressão dos genes LPR-5, SPFR-1, AXIN-1, β -CATENINA e ILK foi maior nos OBs crescidos sobre discos de 45S5 comparado ao BioS-2P. Enquanto a expressão relativa dos genes GSK3- β , DKK-1 e SOST não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os discos. Os dados estão representados na Figura 3.8.

Figura 3.8. Expressão relativa dos genes envolvidos na via de sinalização Wnt Canônica (LPR-5; SFRP-1; AXIN-1; GSK-β; β-CATENINA; ILK; DKK-1; SOST) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

3.3.1.8. Expressão gênica em larga escala

Uma biblioteca composta por 23.794 genes foi utilizada para realização do sequenciamento dos RNAs extraídos dos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 e o Controle, por 10 dias. As comparações foram realizadas dois a dois, e todas as diferenças foram calculadas em escala logarítmica. Inicialmente, foram calculadas as diferenças na expressão dos genes dos OBs crescidos sobre os discos BioS-2P ou 45S5, em relação ao Controle. Os OBs crescidos sobre os discos de 45S5 apresentaram 25 genes sobre-expressos e 21 reprimidos (Tabela 3.3.); OBs crescidos sobre os discos BioS-2P apresentaram 15 genes

sobre-expressos e 11 reprimidos (Tabela 3.4.). Nota-se ainda que os OBs crescidos sobre ambos os discos apresentaram em comum 8 genes sobre-expressos e 4 reprimidos em relação ao Controle (marcados nas tabelas com asterisco). Posteriormente, foi realizada outra análise comparando as diferenças da expressão dos genes dos OBs crescidos nos discos de BioS-2P e 45S5 (Tabela 3.5.), evidenciando que apenas 5 genes encontram-se sobre-expressos e 3 reprimidos.

Tabela 3.3. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de 45S5 comparados com os OBs crescidos sobre o plástico de cultura (Controle)

Genes sobre-expressos	Diferença relativa	Genes reprimidos	Diferença relativa
Rln1	Infinite	Ddah1	3.22
Bglap*	100.48	Lmod1	3.46
Slc36a2	33.84	Akap12	3.59
Cpz	31.28	Mylk	3.62
CD24*	10.99	Fam198b	3.97
Dmp1*	9.47	Grem2	4.04
Megf10	9.20	Sqrdl	4.09
Slc13a5*	8.93	Wfdc1	4.54
Sprn	8.77	Lims2	4.63
Pdzd2	8.33	Gucy1a3	4.87
Spry1*	7.95	Csgalnact1	5.04
Rcor2*	7.47	LOC290595*	5.25
Tubb3	6.75	Lphn2	5.25
Phospho1*	6.02	Mrv1	6.94
Unc5c	5.80	Msln	7.41
Pcsk6	5.76	Cntn2	7.80
Acan*	5.35	Sorbs2	8.44
Bmp3	5.12	Pgm5*	8.76
Loxl4	4.71	Eln*	13.47
Dlx3	3.94	Myh11*	13.67
Cdh2	3.77	Casq2	19.97
Stc2	3.77		
Htra3	3.72		
Cercam	3.70		
Itga10	3.47		

* indicam genes comumente expressos pelos OBs crescidos sobre discos de BioS-2P e 45S5, comparado com o Controle.

Tabela 3.4. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de BioS-2P comparados com os OBs crescidos sobre o plástico de cultura (Controle)

Genes sobre-expressos	Diferença relativa	Genes reprimidos	Diferença relativa
Bglap*	113.53	LOC290595*	5.06
Cadm1	28.75	Smoc1	6.65
Prex1	19.33	Il1rl1	7.12
Tspan11	15.51	Cnn1	7.19
Cd24*	12.40	Pgm5*	7.96
Slc13a5*	10.67	Fhl1	8.12
Chst13	9.70	Myh11*	10.15
Cthrc1	9.28	Nov	12.24
Rcor2*	9.00	Egfl6	16.93
Spry1*	8.93	Eln*	18.73
Dmp1*	7.88	Lce1m	Infinite
Phospho1*	6.93		
Fap	6.63		
Acan*	5.03		
Creb3l1	4.58		

* indicam genes comumente expressos pelos OBs crescidos sobre discos de BioS-2P e 45S5, comparado com o Controle.

Tabela 3.5. Expressão dos genes regulados positivamente ou negativamente (diferença relativa ≥ 2) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) cultivados por 10 dias e crescidos sobre discos de BioS-2P comparados com os OBs crescidos sobre discos de 45S5

Genes sobre-expressos	Diferença relativa	Genes reprimidos	Diferença relativa
Kif20b	3.35	Ubc	2.34
Gbp1	2.69	Notch2	2.65
Mki67	2.52	Ccl3	Infinite
Ube2v2	2.50		
Ranbp2	2.38		

Para validação dos dados do sequenciamento, foi avaliado a expressão relativa dos genes DMP-1, PHOSPHO-1 e CD-24 que foram comumente sobre-expressos e o MYH-11 que foi comumente reprimido nos OBs crescidos sobre ambos os discos em relação ao Controle, aos 10 dias de cultivo. Os genes DMP-1 (Kruskal Wallis, $p < 0,001$), PHOSPHO-1 (Kruskal Wallis, $p = 0,013$) e CD-24 (Kruskal Wallis, $p = 0,001$) apresentaram expressão aumentada e o MYH-11 diminuída (Kruskal Wallis, $p = 0,007$) nos OBs crescidos sobre os discos BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle, confirmando os resultados obtidos no sequenciamento. Os resultados estão representados na Figura 3.9.

Figura 3.9. Expressão relativa dos genes selecionados para validação do sequenciamento (DMP-1, PHOSPHO-1, CD-24 e MYH-11) dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias s. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTB e calibrados em relação à expressão dos genes dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$).

3.3.1.9. Expressão de microRNAs (miRs) relacionados com o processo de osteogênese

Os dados obtidos até o momento evidenciaram que a expressão de muitos genes relacionados com a osteogênese foi maior nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5, em relação ao Controle. Na tentativa de investigar mecanismos envolvidos no processo de diferenciação estimulado pelas superfícies dos discos, foi proposto um ensaio para avaliação do papel de alguns miRs envolvidos no processo de osteogênese e que poderiam mediar os eventos previamente observados.

A expressão dos miRs variou na dependência da superfície de cultivo. Foi identificado aumento da expressão dos miRs -29b, -30c, -34a e -125 nos OBs crescidos sobre discos de BioS-2P, em relação ao 45S5 e Controle (Kruskal Wallis, $p < 0,001$ para todos os miRs avaliados); ainda, a expressão destes miRs foi maior nos OBs crescidos sobre o Controle em relação ao 45S5. A expressão dos miRs -133, -146a, -206 foi menor nos OBs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 em relação ao Controle (Kruskal Wallis, $p < 0,001$; $p = 0,005$ e $p = 0,002$ respectivamente), e as diferenças na expressão dos miRs nos OBs crescidos entre os discos de BioS-2P e 45S5 se deu como se segue: -133: $45S5 < BioS-2P$; -146a: $45S5 = BioS-2P$; -206: $45S5 = BioS-2P$. A expressão do miR-210 foi menor nos OBs crescidos sobre o disco de BioS-2P em relação ao 45S5 e Controle (Kruskal Wallis, $p = 0,005$), dentre os quais não foi

detectado diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados na Figura 3.10.

Figura 3.10. Expressão relativa dos microRNAs relacionados com o processo de osteogênese dos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo small nuclear RNA U6 e calibrados em relação à expressão dos miRs dos OBs crescidos sobre o Controle. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as superfícies (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n=4)

3.3.2 Avaliações dos efeitos do BioS-2P sobre os UMRs

3.3.2.1. Detecção e quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada

Após 5 dias de cultivo foi detectada a presença de nódulos de matriz extracelular mineralizada produzidos pelos UMRs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5. As imagens obtidas por MEV em aumentos que variam de 500x a 5000x evidenciaram a adesão

das células às diferentes superfícies dos discos e a presença dos nódulos (Figura 3.11. A-D). As imagens em maior aumento (20.000x) focam na estrutura dos nódulos (Figura 3.11.-E).

Considerando que as superfícies bioativas são capazes de produzir uma camada de hidroxicarbonoapatita (HCA) quando em contato com fluidos biológicos, discos de BioS-2P e 45S5 foram mantidos na mesma condição de cultivo, mas na ausência de células. As imagens da MEV evidenciaram a presença de depósitos sobre essas superfícies (Figura 3.11, insets), mas com características distintas dos nódulos de mineralização.

Figura 3.11. Fotomicrografias obtidas pela MEV evidenciam a produção de nódulos de matriz mineralizada pelos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias. As imagens nos insets evidenciam o material submetido às mesmas condições de cultivo, mas sem células. Os asteriscos (*) indicam as superfícies dos materiais.

Ainda, a produção de nódulos matriz extracelular mineralizada foi evidenciada por coloração de Von Kossa, e os nódulos foram posteriormente quantificados. Houve uma diminuição na quantidade de nódulos produzido pelos UMRs crescidos sobre os discos de 45S5 em relação ao BioS-2P e o Controle, dentre as quais não foi detectado diferença estatisticamente significativa (Kruskal Wallis; $p=0,044$). Os dados estão representados na Figura 3.12.

Figura 3.12. Nódulos de matriz mineralizada produzidos pelos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias, e sua quantificação. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre as superfícies (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

3.3.2.2. Detecção das proteínas ALP e OPN por Imunofluorescência

As proteínas ALP e OPN foram detectadas nos UMRs cultivados por 5 dias sobre os discos de BioS-2P e 45S5 e o Controle. De uma maneira geral, houve aumento da quantidade de células marcadas positivamente para ALP e OPN quando crescidas sobre o BioS-2P em relação àquelas crescidas sobre o 45S5 e Controle (comparar Figura 3.13 C com A-B; e 3.13 F com D-E).

Os UMRs encontravam-se emitindo projeções citoplasmáticas e distribuídos por toda a superfície. Semelhante às imagens obtidas dos OBs, os UMRs crescidos sobre os discos de BioS-2P e 45S5 apresentaram a mesma perda dos limites celulares com a ausência de sinais de fluorescência, assemelhando-se a estruturas esféricas no interior/acima dos filamentos de actina e dos núcleos (Figura 3.13. B, C, E, F).

Figura 3.13. Detecção das proteínas ALP (indicada com asteriscos) e OPN (indicada nas cabeças das setas) por imunofluorescência, nos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o Thermanox (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias. Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (DAPI). Aumento de 20x. Barra: 100 μ m.

3.3.2.3. Detecção e quantificação das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot

As imagens obtidas das bandas de proteínas e a quantificação destas indicaram um aumento da produção das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN dos UMRs crescidos sobre os discos de BioS-2P em relação ao 45S5 e Controle. Ainda, as proteínas ALP e RUNX2 foram encontradas em maior quantidade nos UMRs crescidos sobre o Controle em relação ao 45S5; e as proteínas DMP-1 e OPN foram encontradas em maior quantidade nos OBs crescidos sobre os discos de 45S5 em relação ao Controle (Figura 3.14.).

Figura 3.14. (A) Detecção das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN por Western Blot e (B) quantificação relativa em relação à expressão de GAPDH, nos osteoblastos da linhagem UMR-106 (UMRs) crescidos sobre o plástico de cultura (Controle) e discos de 45S5 e BioS-2P, por 5 dias.

3.4. DISCUSSÃO

No capítulo anterior, mostramos que o BioS-2P induz a diferenciação osteoblástica de CTMs na ausência do meio osteogênico. Neste capítulo, evidenciamos que o BioS-2P é capaz de modificar a morfologia celular e de estimular a diferenciação osteoblástica, evidenciado pelo aumento da atividade enzimática de ALP, da expressão de genes e de proteínas marcadoras de osteoblastos. Essa estimulação foi observada em duas linhagens osteoblástica, que mostraram comportamento biológico similar quando crescidas sobre o BioS-2P e o padrão ouro para os vidros bioativos, o 45S5

A avaliação por epifluorescência identificou alterações no padrão da marcação da actina dos OBs e UMRs nos diferentes períodos avaliados, corroborando observações anteriores (Moura *et al.*, 2007; Castro, 2009; Martins *et al.*, 2015). A perda do sinal de fluorescência tem sido atribuída à presença de uma barreira mecânica na superfície celular, resultante das reações de superfície com possível internalização de partículas resultantes dessa reação (Martins *et al.*, 2015). A internalização de partículas de sílica-gel e/ou fosfato de cálcio tem sido descrita como um método de carregamento para rastreamento celular e de transfecção (Olton *et al.* 2007, Cao *et al.* 2011; Hum, Boccaccinni, 2012), contudo o impacto desse fenômeno na viabilidade e nas expressões fenotípica e genotípica precisam ser investigados.

As fotomicrografias dos OBs crescidos sobre as diferentes superfícies até o 3^o dia, evidenciaram que a quantidade de células aderidas à superfície do disco de BioS-2P é menor do que o 45S5 e o Controle. Esse achado não deve estar relacionado com a menor adesão de OBs ao BioS-2P porque a expressão dos genes das integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, moléculas fundamentais no mecanismo de adesão célula-substrato (Anselme, 2000), não foram diferentes nos OBs cultivados sobre as diferentes superfícies (dados não mostrados). No entanto, essas diferenças desaparecem no 5^o dia de cultura, concordando com análises de viabilidade e proliferação de células sobre superfícies bioativas que tendem a aumentar com a progressão da cultura (Jones *et al.*, 2007; Ajita *et al.*, 2015). Esses resultados sugerem que a adição de uma segunda fase cristalina não interfere negativamente na capacidade do BioS-2P de promover a adesão celular, característica fundamental dos biomateriais. Como observado para as CTMs, os OBs apresentaram menor proliferação quando cultivados sobre discos de BioS-2P e mais acentuadamente sobre o 45S5, comparados ao Controle. Isso pode ter ocorrido porque nos estágios mais avançados da diferenciação osteoblástica ocorre redução da atividade proliferativa (Beloti e Rosa, 2003; Ojansivu *et al.*, 2015).

O aumento da diferenciação osteoblástica induzido pelo BioS-2P foi comprovado em duas linhagens celulares, OBs diferenciados de medula óssea e UMR-106, utilizando análises das expressões genotípicas e fenotípicas. Foram observados aumentos da atividade de ALP assim como a atividade da ALP *in situ*, da expressão dos genes RUNX2, OSX, BMP-4, OPN e OC e das proteínas ALP, RUNX2, DMP-1 e OPN. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa que evidenciaram aumento da expressão da ALP e da sialoproteína óssea em células crescidas sobre o Biosilicato® e o BioS-2P (Moura *et al.*, 2007; Alves, 2012). O aumento da quantidade e da atividade de ALP, não correspondeu ao aumento da expressão do gene ALP nas células crescidas sobre o BioS-2P, uma vez que a este tende a diminuir a medida que o processo de diferenciação e mineralização avançam (Kauffman *et al.*, 2000). Por outro lado, esse aumento da atividade osteoblástica não parece afetar a formação de matriz mineralizada. Houve formação dessa matriz pelas UMRs em todas as superfícies avaliadas, comprovando que as células atingiram o estágio final da diferenciação e o que o BioS-2P foi superior ao 45S5, mas igual ao Controle. Mais uma vez, esses resultados vão ao encontro daqueles relatados para o Biosilicato® que permitiu mais deposição de matriz mineralizada do que o 45S5 em modelo de cultura de calvária de ratos (Moura *et al.*, 2007).

Apesar do efeito estimulatório da superfícies bioativas no processo de diferenciação celular, os mecanismos moleculares pelos quais o BioS-2P modula esse processo não são totalmente conhecidos. Assim, como uma primeira tentativa de elucidar os mecanismos celulares envolvidos na diferenciação osteoblástica induzida pelo BioS-2P, avaliamos a expressão de genes relacionados às vias das MAPKs e Wnt, bem como a expressão de mRIs que participam no processo de osteogênese.

As MAPKs (também conhecidas como *extracellular signal regulated-kinases*-ERKs) são moléculas de sinalização da superfície celular, ativadas (por fosforilação) em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares e que regulam atividades tais como mitose, apoptose, expressão gênica e da diferenciação celular (Ajita *et al.*, 2015; Johnson, Lapadat, 2002) em adipócitos ou osteoblastos, a partir das CTMs (Ge *et al.*, 2007; Matsuguchi *et al.*, 2009; Greenblatt *et al.*, 2010). Nossos resultados evidenciaram aumento da expressão dos genes MAPK-3 e -8 nos OBs crescidos sobre o BioS-2P e o 45S5 em relação ao Controle, genes importantes no aumento da diferenciação osteoblástica e no processo de mineralização (Wang *et al.*, 2014).

A ativação da via Wnt-Canônica é importante no controle da diferenciação dos osteoblastos a partir de CTMs obtidas da medula óssea (Baron *et al.*, 2006; Ahmadzadeh *et*

al., 2016). Nossos resultados mostraram que o BioS-2P e o 45S5 induziram aumento na expressão de todos os genes investigados, independentemente da sua função nessa via. Baseado nisso, não é possível afirmar se o resultado final seria a ativação ou inibição da via Wnt pelo Bio-S-2P e 45S5. No entanto, a expressão aumentada dos inibidores DKK-1 e SOST em OBs cultivados sobre esses materiais, é mais uma indicação de que essas células estão em estágio mais avançado da diferenciação (Baron *et al.*, 2006; Ahmadzadeh *et al.*, 2016).

O aumento do potencial osteogênico promovido pelo BioS-2P pode ser mediado também por mecanismos pós-transcricionais, como a expressão dos miRs. O painel de miRs relacionados positivamente e negativamente com o processo de osteogênese mostra que o BioS-2P parece modular a expressão desses miRs no sentido de favorecer a diferenciação osteoblástica. Nesse sentido, o BioS-2P aumenta a expressão de miRs envolvidos com a estimulação da osteogênese como o -29b (Li *et al.*, 2008; Kapinas *et al.*, 2010), o -30c (Moorthi *et al.*, 2013), e o 34a (Lopes *et al.*, 2016) e diminui a expressão daqueles envolvidos com a inibição da diferenciação osteoblástica como -133 (Li *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012) e 206 (Inose *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2012). O miR-146 vêm sendo relacionado com o aumento ou diminuição da diferenciação de OBs dependendo do modelo experimental utilizado (Dong *et al.*, 2012). A exceção do miR-210, regulador positivo da diferenciação osteoblástica (Mizuno *et al.*, 2008), que encontra-se reprimido nas culturas de OBs crescidas sobre o BioS-2P.

O aumento da expressão de genes marcadores ósseos nas células crescidas sobre as superfícies BioS-2P em relação ao vidro bioinerte e o 45S5 (Alves, 2012), assim como o aumento da expressão de genes relacionados ao ciclo celular, adesão e apoptose (Xynos *et al.*, 2000b; Xynos *et al.*, 2001) e de genes relacionados à adesão, transporte intracelular e desenvolvimento do esqueleto (Bombonato-Prado *et al.*, 2009), nas células crescidas sobre vidros bioativos, foram descritos. No entanto, esses estudos utilizaram número limitado de genes. Assim, um painel com 23.794 genes de OBs crescidos sobre esses materiais foi avaliado e os dados foram validados pela análise de 4 genes sobre-expressos e 1 gene reprimido utilizando PCR convencional.

Os resultados mostraram que OBs cultivados sobre BioS-2P induziram a expressão diferencial de 26 genes em relação ao controle, sendo 15 sobre-expressos e 11 reprimidos. O 45S5 induziu a expressão de 46 genes em relação ao controle, 25 sobre-expressos e 21 reprimidos. As análises comparativas entre as superfícies dos discos de BioS-2P e 45S5 em relação o Controle evidenciaram que, apesar dos painéis de genes diferencialmente expressos não serem idênticos, apenas 05 genes foram comumente expressos e 03 genes comumente reprimidos. Não há dúvidas de que ambos estimulam a diferenciação osteoblástica, uma vez

que os genes em comum cuja expressão foi aumentada (OCN/Bglap, DMP-1, RCOR-2, PHOSPHO-1, ACAN) ou diminuída (MYH-11 e ELN), são indicativos de um estágio de diferenciação mais avançada (Liu *et al.*, 1997; Sodek *et al.*, 2000; Kalajzic *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2006; Balderman *et al.*, 2012; Millán, 2013; St John *et al.*, 2014; Twine *et al.*, 2014). A similaridade no comportamento biológico do BioS-2P e do 45S5 foi mais uma vez comprovada, o que reflete a semelhança em termos de resposta biológica entre as superfícies bioativas avaliadas. Contudo, é possível que as diferenças encontradas entre o BioS-2P e o 45S5 indiquem que ambos estimulem a atividade osteoblástica por mecanismos intracelulares ligeiramente diferentes.

3.5. CONCLUSÃO

O BioS-2P permite a adesão celular e aumenta a diferenciação dos OBs e UMRs.

CAPÍTULO 4 - EFEITO DO BIOS-2P NA FORMAÇÃO ÓSSEA

4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito do BioS-2P no reparo ósseo de defeitos criados em calotas de ratos.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Preparação das amostras

Os arcabouços de BioS-2P foram obtidos a partir do BioS-2P denso, de acordo com o método descrito por Kido *et al.*, (2013). Brevemente, o BioS-2P denso foi particulado, misturado ao carbono negro como agente porogênico e posteriormente sinterizado para evaporação do carbono negro e fusão das partículas. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados arcabouços de BioS-2P medindo 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura.. Previamente à realização do procedimento cirúrgico para a implantação, os arcabouços foram esterilizados em estufa a 180 °C por 2 h, acondicionados em placas de 48 poços (Corning) e mantidos submersos em 100 µL de ME por 18 h, em incubadora (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico.

4.2.2. Determinação dos grupos experimentais

Foram utilizados 15 ratos machos Wistar com peso aproximado de 200 g. Os defeitos criados nas calotas dos animais foram implantados com arcabouço de BioS-2P por 4, 8 e 12 semanas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Distribuição dos grupos em relação ao tempo experimental.

	BioS-2P sem células		
Tempos (semanas)	4	8	12
Nº Animais	5	5	5

4.2.3. Caracterização do arcabouço de BioS-2P por microtomografia computadorizada (µTC)

A análise microtomográfica do arcabouço de BioS-2P foi feita por meio do microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, 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 2D do próprio equipamento e as

reconstruções 3D foram feitas pelo software NRecon (Bruker). Após as reconstruções, os parâmetros analisados foram a porcentagem de porosidade e a distribuição dos poros (n=3).

4.2.4. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram submetidos à cirurgia para a preparação dos defeitos ósseos nas calotas e implantação dos arcabouços. A anestesia foi realizada com solução de Ketamina (7 mg/100 g de peso corporal) (Agener União) e Xilazina (0,6 mg/100 g de peso corporal) (Calier) administrada por via intramuscular. Após tricotomia e anti-sepsia na região dorsal da cabeça com solução de polivinil pirrolidona alcoólica - PVPI (Rioquímica, RJ, Brasil), a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital, expondo os ossos parietais. O periósteo foi descolado e o defeito foi produzido unilateralmente, utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro externo (Neodent, SC, Brasil) sob irrigação abundante com soro fisiológico. O arcabouço de BioS-2P foi removido do poço da placa de cultura e imediatamente implantado nos defeito ósseo. Ao final do procedimento, a pele foi suturada com mononylon 4.0 (Ethicon Ltd., NJ, EUA) e a ferida cirúrgica foi lavada com solução de PVPI tópico. Em seguida, os animais foram medicados com uma dose de anti-inflamatório não esteróide Flunixin meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Merck) no pós-operatório imediato e após 24 h, e com uma dose única de uma solução de antibióticos contendo: Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, SP, Brasil).

4.2.5. Eutanásia e coleta do material

Ao final de 4, 8 e 12 semanas, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Calier) e as calotas foram removidas, reduzidas e armazenadas em potes plásticos identificados contendo formalina 10% tamponada (ph=7) por até 48 horas. Posteriormente as peças foram processadas para as análises microtomográfica, morfométrica e histológica.

4.2.6. Análises microtomográfica e morfométrica

A análise microtomográfica foi realizada como descrito no item 4.2.3, por meio do μ TC. Após as reconstruções, foram analisados, na região dos defeitos ósseos implantados, os seguintes parâmetros: 1. volume ósseo; 2. volume ósseo/volume total ; 3. superfície óssea; 4. Superfície/volume ósseo; 5. número de trabéculas; 6. separação trabecular; 7. espessura

trabecular. Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research e descritos por Parfitt *et al.* (1987).

4.2.7. Análise histológica

Após a análise microtomográfica, os espécimes foram preparados para a obtenção de cortes histológicos não-descalcificados. Optamos por esta metodologia porque os arcabouços de BioS-2P danificam a lâmina de micrótomos convencionais utilizados para cortes histológicos descalcificados e consequentemente não produz material histológico de boa qualidade. As amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois e incluídas em resina acrílica (LR White hard grade, London Resin Company Ltd, Reino Unido). Os blocos foram seccionados ao meio utilizando um micrótomo de precisão (Exakt, HA, Alemanha), lixados e polidos (Exakt). De cada bloco foram obtidas duas lâminas para coloração e observação em microscopia de luz. Para isso, a face polida foi colada a uma lâmina de vidro e o bloco novamente cortado, deixando aderido à lâmina um corte com espessura aproximada de 40 µm, que foi desgastado e polido até apresentar aproximadamente 20 µm de espessura. Esta face foi submetida à coloração utilizando os corantes azul de Stevenel e vermelho de Alizarina, conforme descrito por Maniatopoulos *et al.* (1986).

A análise histológica foi focada no tecido ósseo neoformado, com relação à presença de osso imaturo e/ou trabecular e tecido osteóide, como previamente descrito (Sicchieri *et al.*, 2012). Também foram avaliadas eventuais reações de corpo estranho, presença de células gigantes multinucleadas e cápsulas de tecido fibroso. Para isso, as imagens foram capturadas por uma câmera digital DC 300F (Leica), acoplada a um microscópio DMLB (Leica).

4.2.8. Avaliação da capacidade osseoindutora do arcabouço de BioS-2P

Para a determinação da capacidade do BioS-2P de induzir a formação óssea ectópica, os arcabouços foram implantados no interior da musculatura dorsal de 3 ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 200 g, e foram mantidos por 8 semanas.

Previamente à cirurgia de implantação, os arcabouços de BioS-2P estéreis foram mantidos imersos em 100 µL de ME por 18 h em incubadora, como descrito no item 4.2.1. Os animais foram anestesiados como previamente descrito. Após anti-sepsia e tricotomia da região dorsal, próxima à coluna vertebral, foi realizada uma incisão em pele de aproximadamente 0,5 cm, seguido de divulsão do plano muscular. Os arcabouços de BioS-2P foram retirados dos poços das placas e imediatamente implantados no interior do tecido muscular. Posteriormente, a pele foi suturada com mononylon 4.0 (Ethicon). Os animais receberam a medicação como descrito no item 4.2.4. Ao final de 8 semanas, os animais foram

eutanaziados com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Calier) e as peças foram removidas e armazenadas em formalina 10% tamponada (ph=7), para posterior processamento histológico como descrito no item 4.2.7.

4.2.9. Análise estatística

Os dados foram comparados utilizando a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Caracterização do arcabouço BioS-2P por μ TC

As imagens tridimensionais obtidas pela reconstrução dos cortes microtomográficos evidenciaram um material altamente poroso (Figura 4.1.). As análises morfométricas determinaram uma porosidade de $76 \pm 5,1\%$, com poros variando de 10 a 800 μ m, sendo que a maior porcentagem dos poros encontram-se na faixa entre 100 e 500 μ m, distribuídos conforme representado na Figura 4.2.

Figura 4.1. Reconstruções tridimensionais obtidas do arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P).

Figura 4.2. Distribuição dos diferentes tamanhos dos poros por porcentagem.

4.3.2. Análises microtomográfica e morfométrica

As reconstruções microtomográficas e os cortes tomográficos evidenciaram a presença de tecido ósseo neoformado a partir da 4ª semana (Figura 4.3. A, D e G), no interior e na periferia do defeito, e em íntimo contato com o tecido ósseo nativo e com a superfície do arcabouço de BioS-2P, mantendo a mesma característica na 8ª (Figura 4.3. B, E e H) e 12ª

semana (Figura 4.3. C, F e I). Após 12 semanas de implantação, ainda é possível detectar o arcabouço de BioS-2P, indicando que ele não sofreu degradação (Figura 4.3. C, F e I).

Figura 4.3. Reconstruções microtomográficas (A-C) e cortes tomográficos axiais (D-F) e sagitais (G-I) dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e mantidos por 4 (A, D, G), 8 (B, E, H) e 12 semanas (C, F, I). Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material..

As análises morfométricas do tecido ósseo neoformado após 4, 8 e 12 semanas, indicaram ausência de diferenças estatisticamente significantes para todos os parâmetros avaliados: volume ósseo (Kruskal Wallis; $p=0,914$), volume ósseo/volume total (Kruskal Wallis; $p=0,914$), superfície óssea (Kruskal Wallis; $p=0,289$), superfície/volume ósseo (Kruskal Wallis; $p=0,289$), número de trabéculas (Kruskal Wallis; $p=0,595$), separação trabecular (Kruskal Wallis; $p=0,181$) e espessura de trabéculas (Kruskal Wallis; $p=0,533$). Os dados estão representados na Figura 4.4.

Figura 4.4. Parâmetros morfométricos obtidos por microtomografia computadorizada, após reconstrução do tecido ósseo neoformado nos defeitos criados em calotas de ratos e implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), após 4, 8 e 12 semanas. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significante em nenhum dos parâmetros avaliados (Kruskal Wallis, $p \geq 0,05$).

4.3.3. Análise histológica

A análise histológica realizada nos cortes axiais e sagitais confirmaram as observações da análise microtomográfica, mostrando a presença de tecido ósseo formado predominantemente no interior dos defeitos (Figura 4.5 A-F) e em íntimo contato com o BioS-2P (Figura 4.5. G-I), nos três períodos avaliados. Confirmando a análise microtomográfica, não foram observadas diferenças nos aspectos histológicos do osso formado ao longo dos períodos avaliados e, desde a 4ª semana, não havia sinais de inflamação crônica.

Figura 4.5. Fotomicrografias dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e mantidos por 4 (A, D, G), 8 (B, E, H) e 12 semanas (C, F, I). Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. A-C 1,6x; D-F 2,5x; G-I 10x. Barra 100 μ m

4.3.4 Avaliação da capacidade osseoindutora do arcabouço de BioS-2P

Após 8 semanas de implantação os arcabouços de BioS-2P não apresentaram sinais evidentes de degradação (Figura 4.6. A-F). Em todos os cortes, nota-se a presença de grande quantidade de células multinucleadas em íntimo contato com a superfície do material (Figura 4.6. C e F, asteriscos).

Figura 4.6. Fotomicrografias que evidenciam a resposta tecidual aos arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), implantados na região intramuscular e mantidos por 8 semanas. Nota-se a presença de grande quantidade de tecido conjuntivo e ausência de tecido ósseo neoformado. As setas indicam a presença do material remanescente e os asteriscos (*) indicam a presença de células multinucleadas ao redor da superfície do material. Coloração por vermelho de alizarina e azul de Stevenel. A,D: 2,5x; B,E: 10x; C,F: 20x. Barra 50 μ m.

4.4. DISCUSSÃO

A avaliação do comportamento biológico do BioS-2P revelou respostas completamente diferentes em relação ao sítio de implantação. Quando implantado em defeitos ósseos, os arcabouços foram capazes de estimular a formação óssea no interior dos defeitos e em íntimo contato com a superfície do material. No entanto, a implantação em sítio intramuscular, além de não formar osso resultou em grande formação de células multinucleadas.

Os arcabouços de BioS-2P apresentam arquitetura trabecular que se assemelha à estrutura do tecido ósseo, com porosidade em torno de 76% sendo esses poros interconectados e com diâmetros médios variando entre 100 a 500 μ m. Tais características aproximam o BioS-2P do arcabouço ideal que deve apresentar, dentre outros requisitos, porosidade adequada para que os eventos biológicos ocorram (tais como a migração celular e angiogênese), sem diminuir as propriedades mecânicas (Karageorgiou, Kaplan, 2005). Estudos prévios mostraram que a adição da segunda fase cristalina torna o BioS-2P um material com resistência mecânica adequada para aplicação na engenharia de tecidos (Peitl-Filho *et al.*, 2012); nossas avaliações evidenciaram que o arcabouço apresenta porosidade e tamanho de poros adequados, uma vez que porosidade acima de 65% favorece a formação óssea *in vivo* (Kasten *et al.*, 2008). O tamanho e a interconectividade dos poros também são fundamentais no processo de regeneração tecidual: poros entre 100 e 500 μ m se mostraram

ideais para o crescimento celular, transporte de nutrientes, neoformação vascular (Karageorgiou, Kaplan, 2005; Sicchieri, 2010; Sicchieri *et al.*, 2012).

Outra característica do arcabouço de BioS-2P é a sua relativa estabilidade após implantação *in vivo*, comprovada pela aparente falta de degradação, de acordo com o que é preconizado para materiais altamente porosos, a fim de não comprometer sua integridade mecânica e estrutural (Karageorgiou, Kaplan, 2005). Essa última observação não corrobora com àquelas descritas para o BioS-2P implantado em tíbias de rato, que apresentaram altas taxas de reabsorção após 21 dias (Kido *et al.*, 2015). Tais discrepâncias podem ser devidas ao modelo experimental utilizado porque enquanto nós utilizamos um defeito ósseo sujeito à baixa demanda mecânica, defeitos em tíbia estão sujeitos à maior carga. Por outro lado, características dos arcabouços não descritas por Kido *et al.* (2015), e métodos de análise das respostas, morfometria por tomografia computadorizada e histologia em cortes por desgaste versus histologia por descalcificação, também podem ter contribuído para essas discrepâncias de resultados.

A avaliação de biomateriais aplicados à regeneração óssea é adequadamente conduzida utilizando o modelo animal proposto nesse estudo (Gomes e Fernandes, 2011). Defeitos nas calotas de ratos, únicos, e de 8 mm são frequentemente utilizados e considerados como críticos; contudo, o conceito de defeito crítico vem sendo discutido, e defeitos menores podem ser aplicados, desde que estes não regenerem espontaneamente no período do estudo (Spicer *et al.*, 2012). Ensaios prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que defeitos de 5mm em calotas de ratos mantidos sem tratamento por períodos de até 8 semanas, não são preenchidos sequer parcialmente por tecido ósseo; ainda, os cortes histológicos evidenciaram a presença de tecido conjuntivo denso por toda a extensão do defeito (Santos, 2014). Para minimizar o uso de animais na obtenção de resultados já conhecidos, o controle vazio foi descartado nesse estudo.

Ao final de 4, 8 e 12 semanas, as análises microtomográficas e histológicas evidenciaram que o arcabouço de BioS-2P, implantado em defeitos de calvária de ratos, é capaz de conduzir a neoformação óssea. No entanto, esse efeito foi limitado e não resultou na completa regeneração dos defeitos; ainda, a formação óssea não aumentou com o tempo de implantação. Como esperado, o BioS-2P não causou qualquer resposta desfavorável local, evidenciado pela ausência de resposta inflamatória e pelas características histológicas do tecido ósseo formado, bastante próximas do tecido ósseo pré-existente.

A partir da observação da propriedade ostecondutora, foi sugerida a capacidade osteoindutora dos vidros bioativos (Schepers *et al.*, 1998). Osteoindução é o processo pelo

qual o material induz a diferenciação de células indiferenciadas em células osteoprogenitoras, e em áreas ectópicas (Miron, Zhang, 2012), sendo esta última característica fundamental para comprovar a verdadeira capacidade osteoindutora do material (Zaffe *et al.*, 2005; Miron, Zhang, 2012). Estudos sobre a propriedade osteoindutora dos biovidros e vitrocerâmicas são controversos e os diferentes modelos experimentais utilizados dificultam o estabelecimento de um consenso (Yuan *et al.*, 2001; Carlo *et al.*, 2007). Nós mostramos em capítulos anteriores que o BioS-2P é capaz de induzir a diferenciação de CTMs em OBs *in vitro*, contudo não é capaz de induzir a formação óssea no interior de tecido muscular. Assim, não podemos classificá-lo, baseados nos nossos resultados, como um material osteoindutor *in vivo*.

4.5. CONCLUSÃO

O arcabouço de BioS-2P é altamente poroso, com poros de diferentes diâmetros e interconectados. A formação óssea observada na periferia e no interior dos defeitos implantados com BioS-2P mostram que ele é osteocondutor, mas a ausência de formação óssea em sítio intramuscular mostra que ele não é osteoindutor.

CAPÍTULO 5: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE CTMS E OBS E O BIOS-2P NA FORMAÇÃO ÓSSEA

5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito da associação do BioS-2P com CTMs e OBs no reparo de defeitos ósseos criados em calotas de ratos.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Preparação das amostras

Os arcabouços de BioS-2P foram preparados como descrito no item 4.2.1.

5.2.2. Determinação dos grupos experimentais

Foram utilizados 15 ratos machos Wistar com peso aproximado de 200 g. Os animais receberam 3 tipos de tratamento: arcabouço de BioS-2P carregado com CTMs, arcabouço de BioS-2P carregado com OBs e arcabouço de BioS-2P sem células (Tabela 5.1.). Todas as avaliações foram realizadas após 8 semanas de implantação.

Tabela 5.1. Distribuição dos grupos em relação ao tratamento.

Grupos	Tratamentos		
	BioS-2P com CTMs	BioS-2P com OBs	BioS-2P sem células
Nº Animais	5	5	5

5.2.3. Obtenção e cultura das CTMs e dos OBs

Para os ensaios descritos a seguir, as CTMs e os OBs foram obtidos e cultivados como descrito no item 1.2.1. Contudo, para a realização do ensaio proposto, os OBs foram cultivados por 7 dias previamente ao carregamento nos arcabouços.

5.2.4. Carreamento das células nos arcabouços de BioS-2P e avaliação da eficácia da incorporação

O meio de cultura das garrafas contendo CTMs e OBs cultivados em ME e MO respectivamente, foi removido e foram adicionados 9,5 mL de solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 500 µL collagenase tipo II 4000 U e 500 µL de EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, as células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific) e ajustado o volume de 100 µL para o plaqueamento na densidade de 2×10^5 células por arcabouço, previamente dispostos em poços de placas de poliestireno de 48 poços

(Corning Incorporated). As culturas foram mantidas por 18 h em incubadora para permitir a incorporação e adesão celular (Sanyo Electric Co.) a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico.

Para determinar a eficácia da incorporação de células aos arcabouços, após retirá-los dos poços, foi realizada tripsinização e contagem das células remanescentes; a diferença entre o número de células plaqueadas e remanescentes foi utilizada para expressar a eficácia da incorporação, em porcentagem. Para a avaliação qualitativa da incorporação e distribuição das células nos arcabouços de BioS-2P, as mesmas foram observadas por fluorescência direta após o período de incubação. Brevemente, os arcabouços de BioS-2P com células foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (Labsynth) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à TA. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (Acros Organics, EUA) 0,5% em PB, durante 10 min. Para visualização das membranas e núcleos celulares foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, EUA) 1:200, e 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Após montagem de lâmina de vidro (Fisherbrand, EUA) sobre os arcabouços, com meio de montagem anti-fade Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas em microscópio de epifluorescência Axio Imager (Zeiss) na objetiva de 20x, acoplado ao sistema ApoTome (Zeiss). As imagens foram sobrepostas e analisadas utilizando-se o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

5.2.5. Procedimento Cirúrgico

Após a incorporação das células, os arcabouços sem células ou contendo CTMs ou OBs foram cuidadosamente removidos dos poços e imediatamente implantados nos defeitos criados nas calotas dos ratos como descrito no item 4.2.4.

5.2.6. Detecção *in vivo* dos OBs incorporados ao BioS-2P e implantados nos defeitos ósseos de calotas de ratos

Para esse ensaio foram utilizados OBs contendo o gene da luciferase 2, detectadas por bioluminescência através da reação com a luciferina, utilizando um método não invasivo e que permite avaliações temporais.

Os vírus contendo o gene da luciferase foram produzidos e cedidos pela equipe do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas do Hemocentro de Ribeirão Preto. Para a transdução, os vírus foram adicionados às culturas de CTMs a uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 3 na presença de 8 µg/mL de polibreno. As células foram incubadas por 18 horas a 37 °C quando o meio foi substituído e, após 48 horas, as CTMs foram submetidas à seleção com 1 µg/mL de

puromicina por 6 dias, para a eliminação das células que não haviam sido transduzidas. Ao término, as células selecionadas foram congeladas em solução contendo DMSO 10%. No momento oportuno, as CTMs transfectadas foram descongeladas, expandidas em ME e posteriormente mantidas em MO por 7 dias, para obtenção dos OBs. Os OBs foram incorporadas aos arcabouços de BioS-2P como descrito no item 5.2.4 e células/arcabouço foram implantados nos defeito criados nas calotas dos ratos (n=3), como descrito no item 4.2.4. As imagens de bioluminescência foram adquiridas utilizando o IVIS-100 (*In Vivo* Imagins System, Xenogen, CA, EUA), no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Para obtenção das imagens *in vivo*, os animais foram previamente anestesiados com Isoflurano 2% (Cristal Pharma, MG, Brasil) em uma câmara específica; uma vez anestesiados, foi realizada injeção subcutânea, na região dos defeitos implantados, de 100 µL de solução de luciferina na concentração de 30mg/mL. Após 10 min, os animais foram transportados para a câmara de imagens, onde foram mantidos anestesiados com Isoflurano 1%. A intensidade do sinal, medida por fótons/s, está representado por cores que variam do roxo (menos intenso) até o vermelho (mais intenso). Para quantificação dos sinais, foram selecionados os picos de emissão, imediatamente antes da queda. As imagens *ex-vivo* dos defeitos implantados foram obtidas imediatamente após a eutanásia dos animais e remoção das peças.

5.2.7. Eutanásia e coleta do material

Ao final de 8 semanas, os animais foram eutanasiados com dose excessiva de Ketamina (Agener União) e Xilazina (Calier) e as calotas removidas, reduzidas, armazenadas em potes plásticos identificados contendo formalina 10% tamponada (ph=7), por até 48 horas. Posteriormente as peças foram processadas para análises microtomográfica, morfométrica e histológica.

5.2.8. Análises microtomográfica e morfométrica

A análise microtomográfica foi realizada como previamente descrito no item 4.2.6, por meio do µTC SkyScan 1172 (SkyScan). Após as reconstruções, os mesmo parâmetros descritos no item 4.2.6 foram avaliados.

5.2.9. Análise histológica

Após a análise microtomográfica, os espécimes foram preparados para a obtenção de cortes histológicos não-descalcificados como descrito no item 4.2.7.

5.2.10. Análise estatística

Os dados foram comparados utilizando a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Avaliação da eficácia do carregamento das células no BioS-2P e detecção das células no interior do arcabouço

A eficácia do carregamento de CTMs e OBs foi de aproximadamente 90% para as CTMs e 81% para os OBs (Figura 5.1. A). Ao final de 24h de cultivo, as células encontram-se aderidas no interior dos poros do arcabouço (Figura 5.1. B).

Figura 5.1. (A) Avaliação da quantidade de células-tronco mesenquimais (CTMs) e osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P), após plaqueamento na densidade de 2×10^5 e incubação por 18 h. (B) OBs cultivados por 18 h e aderidos a um dos poros do arcabouço de BioS-2P. Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina) e núcleo (Dapi). Imagem adquirida em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de ApoTome. Aumento de 20x. Barra: 100 µm.

Os ensaios de bioluminescência evidenciaram a presença dos OBs transfectados com luciferase incorporados ao arcabouço de BioS-2P e implantados nos defeitos, a partir de 6 h pós-implantação, atingindo o pico da intensidade de emissão de fótons em uma 1 semana. Após esse período, a intensidade de emissão apresentou redução contínua até o desaparecimento na 4ª semana (Figura 5.2.).

Figura 5.2. Imagens e quantificação de bioluminescência emitida pelos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) transfectados com luciferase, incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e implantados em defeitos de calotas de ratos. Imagens obtidas após injeção local de 100 μ L luciferina (30mg/mL).

Após a perda do sinal, os animais foram eutanaziados e as peças contendo o material foram removidas, o periósteo destacado, e submetidas a outra leitura, para determinação *ex-vivo* da localização das células. Nota-se pelas imagens (Figura 5.3), que os OBs encontram-se localizadas nas regiões onde os arcabouços foram implantados.

Figura 5.3. Imagens de bioluminescência emitida pelos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) transfectados com luciferase, incorporados ao arcabouço de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) e implantados em dos defeitos de calotas de ratos. Imagens obtidas após injeção local de 100 μ L luciferina (30mg/mL), imediatamente após a eutanásia dos animais.

5.3.2. Análises microtomográfica e morfométrica

As reconstruções microtomográficas e os cortes tomográficos evidenciaram a presença de tecido ósseo neoformado no interior e na periferia do defeito, e em íntimo contato

com o tecido ósseo nativo e com a superfície do arcabouço de BioS-2P sem células (Figura 5.4 A, D e G), associado às CTMs (Figura 5.4 B, E e H) e associados aos OBs (Figura 5.4 C, F e I).

Figura 5.4. Reconstruções microtomográficas (A-C) e cortes tomográficos axiais (D-F) e sagitais (G-I) dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem células (A, D, G), associado com células-tronco mesenquimais indiferenciadas (CTMs) (B, E, H) e associado com osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) (C, F, I), todos mantidos por 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material.

As análises morfométricas do tecido ósseo neoformado nos defeitos implantados sem célula, associado às CTMs ou associado aos OBs, após 8 semanas, indicaram ausência de diferenças estatisticamente significantes para todos os parâmetros avaliados: volume ósseo (Kruskal Wallis; $p=0,052$); volume ósseo/volume total (Kruskal Wallis; $p=0,082$); superfície óssea (Kruskal Wallis; $p=0,557$), superfície/volume ósseo (Kruskal-Wallis, $p=0,805$), número de trabéculas (Kruskal Wallis; $p=0,172$); separação trabecular (Kruskal Wallis; $p=0,854$) e espessura trabecular (Kruskal Wallis; $p=0,078$). Os dados estão representados na Figura 5.5.

Figura 5.5. Parâmetros morfométricos obtidos por microtomografia computadorizada, do tecido ósseo neoformado nos defeitos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem célula, BioS-2P associado às células-tronco mesenquimais indiferenciadas (CTMs) e BioS-2P associado aos osteoblastos em fase inicial de diferenciação (OBs) após 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$).

5.3.3. Análise histológica

A análise histológica realizada nos cortes axiais e sagitais confirmaram as observações da análise microtomográfica, mostrando a presença de tecido ósseo formado predominantemente no interior dos defeitos e em íntimo contato com o BioS-2P independente da associação com células (Figura 5.6 A-F). Nenhum dos grupos avaliados apresentou sinais de inflamação crônica.

Figura 5.6. Fotomicrografias dos defeitos ósseos criados em calotas de ratos implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) sem células (A, D, G), BioS-2P associado com células-tronco mesenquimais (B, E, H) e BioS-2P associado com osteoblastos em fase inicial de diferenciação (C, F, I) e mantidos por 8 semanas. Os asteriscos (*) indicam o tecido ósseo neoformado e as cabeças de setas indicam o tecido ósseo neoformado em íntimo contato com a superfície do material. A-C 1,6x; D-F 2,5x; G-I 10x. Barra 100 µm

5.4. DISCUSSÃO

Nos capítulos anteriores mostramos que o BioS-2P é capaz de induzir, *in vitro*, a diferenciação das CTMs e OBs; capaz de aumentar, *in vitro*, a diferenciação de OBs; e quando fabricado na forma de arcabouços, é capaz de conduzir a neoformação óssea. Contudo, quando combinado com CTMs ou OBs e implantado em defeitos ósseos criados nas calotas de ratos não houve formação óssea maior do que quando implantado sem células.

Diferentes métodos (estáticos e dinâmicos) de incorporação podem ser empregados para carrear células no interior de arcabouços porosos (Holy *et al.*, 2000; Sikavitsas *et al.*, 2002; Holtorf *et al.*, 2005). Em estudos anteriores, utilizamos um método dinâmico de repetidos ciclos de centrifugação, que permite carregamento eficaz com distribuição homogênea das células no interior do arcabouço, sem interferir com a integridade celular (Beloti *et al.*, 2009; Sicchieri, 2012; Santos *et al.*, 2015). Contudo, esse método não se mostrou efetivo para os arcabouços de BioS-2P, devido à combinação de alta porcentagem de porosidade e ao tamanho dos poros. Por isso optamos por um método estático, onde as células foram depositadas sobre os arcabouços e ambos mantidos em cultura (Ponticiello *et*

al., 2000; Detsch *et al.*, 2015); de fato, após 24 horas de cultivo, mais de 80% das células encontravam-se aderidas ao arcabouço, demonstrando a eficiência do método. Células incorporadas por esse método e cultivadas *in vitro* no interior de arcabouços porosos de 45S5 também proliferaram e se diferenciaram, por períodos de até 35 dias (Detsch *et al.*, 2015).

É interessante observar que as células, ao menos as CTMs, combinadas com os arcabouços, aparentemente, mostraram atividade proliferativa, como observado pelo aumento do sinal de luminescência até 7 dias após a implantação *in vivo*. A partir de 7 dias ocorre diminuição gradativa do sinal que, praticamente, não é mais detectado aos 28 dias. Avaliações sobre a permanência *in vivo* de células implantadas com arcabouços sugerem que, na dependência da natureza química do arcabouço, as células podem permanecer de 3 a 8 semanas nos locais de implantação (Zhang *et al.*, 2014; Dupont *et al.*, 2010). No entanto, mesmo quando as células foram detectadas por apenas 3 semanas, houve aumento na formação de tecido ósseo (Dupont *et al.*, 2010). Portanto, a ausência de efeito observada para a combinação de BioS-2P com células na formação óssea, não pode ser explicada pela curta permanência delas no local.

Vários estudos têm demonstrado o efeito sinérgico da associação de diferentes tipos de arcabouços e CTMs na neoformação óssea (Petite *et al.*, 2000; Livingston *et al.*, 2002; Beloti *et al.*, 2012; El-Gendy *et al.*, 2013; Handel *et al.*, 2013; Eldesoqi *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014; Garcia-Gareta *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015; de Misquita *et al.*, 2016), bem como de osteoblastos (Gallego *et al.*, 2010; Tripathi *et al.*, 2011; Beloti *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2015). No entanto, em muitos desses estudos, os arcabouços utilizados não foram capazes de promover significativa formação de tecido ósseo, contrário ao observado para o BioS-2P. Portanto, é possível sugerir que, tanto as CTMs como os OBs, não foram capazes de aumentar a quantidade de tecido ósseo formado além daquela produzida pelo BioS-2P. Como existem evidências de que as células promovem a formação óssea modificando o micro-ambiente (Todeschi *et al.*, 2015), o que também ocorre com os produtos de dissolução dos materiais vítreos (Hoppe *et al.*, 2011), é possível que para esses arcabouços não seja observado um efeito sinérgico com as células. Há que se ressaltar que, a despeito de ter ocorrido formação de tecido ósseo nos defeitos tratados com BioS-2P combinado ou não com células, essa estratégia não resultou na regeneração dos defeitos.

5.5. CONCLUSÃO

A associação do arcabouço de BioS-2P com CTMs ou OBs não resultou em aumento da formação óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15:109-116.

Abdollahi S, Ma AC, Cerruti M. Surface transformations of Bioglass 45S5 during scaffold synthesis for bone tissue engineering. *Langmuir.* 2013;29:1466-1474.

Abuna RP, De Oliveira FS, Santos Tde S, Guerra TR, Rosa AL, Beloti MM. Participation of TNF- α in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation. *J Cell Physiol.* 2016;231:204-214.

Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, Shahjahani M, Saki N. Wnt/ β -catenin signaling in bone marrow niche. *Cell Tissue Res.* 2016;363:321-335.

Ajita J, Saravanan S, Selvamurugan N. Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;53:142-149.

Alves, OC. Análise da diferenciação osteoblástica in vitro sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos. Dissertação. Ribeirão Preto, 2012.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40: 363-408.

Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21:667-681.

Azenha MR, Peitl O, Barros VM. Bone response to biosilicates with different crystal phases. *Braz Dent J.* 2010;21:383-389.

Azenha MR, Lacerda SA, Marão HF, Peitl-Filho O, Filho OM. Evaluation of Crystallized Biosilicate in the Reconstruction of Calvarial Defects. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015;14:659-665.

Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C. Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:202.

Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, Lebeche D, Hajjar RJ, Loscalzo J, Leopold JA. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003905.

Baron R, Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dep Biol*. 2006;76:103-127.

Barzilay R, Sadan, Melamed E, Offen D. Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains. *Cytotherapy*. 2009; 11:435-442.

Bell RB, Gregoire C. Reconstruction of mandibular continuity defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2: a note of caution in an atmosphere of exuberance. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:2673-2678.

Beloti MM, Tambasco De Oliveira P, Perri De Carvalho PS, Rosa AL. Seeding osteoblastic cells into a macroporous biodegradable CaP/PLGA scaffold by a centrifugal force. *J Biomater Appl*. 2009;23:481-495.

Beloti MM, Sicchieri LG, de Oliveira PT, Rosa AL. The Influence of Osteoblast Differentiation Stage on Bone Formation in Autogenously Implanted Cell-Based Poly(Lactide-Co-Glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:999-1005.

Bombonato-Prado KF, Bellesini LS, Junta CM, Marques MM, Passos GA, Rosa AL. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88:401-408.

Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30:546-554.

Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*. 2005;26:3873-3879.

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996;17:137-146.

Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Schwartz Z. Cell biology of calcified tissues: experimental models of differentiation and mechanisms by which local and systemic factors exert their effects. *Connect Tissue Res*. 1996;35, 63-70.

Bydlowski SP, DebesII AA, MaselliIII; LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31:25-35.

Cao X, Deng W, Wei Y, Su W, Yang Y, Wei Y, Yu J, Xu X. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:3335-3349.

Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007;28:4240-4250.

Carlo EC, Borges APB, Rezende CMF, Moreira JCL, Fonseca CC, Pontes KC, Duarte TS. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. *Ceres*. 2007;54:316.

Castro, LMS. Osteogênese in vitro sobre vitrocerâmica 100% cristalina e altamente bioativa (Biosilicato®): efeitos do condicionamento de superfície e dos produtos de dissolução iônica. Ribeirão Preto, 2009.

Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:2414-2425.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:7841-7845.

Crovace MC. Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato®. São Carlos, 2010.

Crovace MC, Sousa MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED. Biosilicate® - a multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *J Non-Crystal Solids* 2016;432:90-110.

de Oliva MA, Maximiano WM, de Castro LM, da Silva PE Jr, Fernandes RR, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL, de Oliveira PT. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem*. 2009;57:265-276.

de Oliveira PT, de Oliva MA, Maximiano WM, Sebastião KE, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2008;56:629-638.

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

Detsch R, Alles S, Hum J, Westenberger P, Sieker F, Heusinger D, Kasper C, Boccaccini AR. Osteogenic differentiation of umbilical cord and adipose derived stem cells onto highly porous 45S5 Bioglass®-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103:1029-1037.

de Misquita MR, Bentini R, Goncalves F. The performance of bone tissue engineering scaffolds in in vivo animal models: A systematic review. *J Biomater Appl.* 2016:22

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

Dong S, Yang B, Guo H, Kang F. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418:587-591.

Dupont KM, Sharma K, Stevens HY, Boerckel JD, García AJ, Guldberg RE. Human stem cell delivery for treatment of large segmental bone defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:3305-3310.

El-Gendy R, Yang XB, Newby PJ, Boccaccini AR, Kirkham J. Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 Bioglass® based scaffolds in vitro and in vivo. *Tissue Eng Part A.* 2013;19:707-715.

Eldesoqi K, Henrich D, El-Kady AM, Arbid MS, Abd El-Hady BM, Marzi I, Seebach C. Safety evaluation of a bioglass-polylactic acid composite scaffold seeded with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. *PLoS One.* 2014;9:e87642.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17:331-340.

Gallego L, Junquera L, García E, García V, Alvarez-Viejo M, Costilla S, Fresno MF, Meana A. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:1179-1187.

García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;81:112-121.

Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*. 2007;176:709-718.

Granito RN, Ribeiro DA, Rennó ACM, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20:2521-2526.

Granito RN, Rennó ACM, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, Driusso P, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate): a biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;97:139-147.

Greenblatt MB, Shim JH, Zou W, Sitara D, Schweitzer M, Hu D, Lotinun S, Sano Y, Baron R, Park JM, Arthur S, Xie M, Schneider MD, Zhai B, Gygi S, Davis R, Glimcher LH. The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120: 2457-2473.

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

Handel M, Hammer TR, Noeaid P, Boccaccini AR, Hoefer D. 45S5-Bioglass®-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:2703-2712.

He Y, Dong Y, Lin R, Chen X. Ectopic osteogenesis and scaffold biodegradation of tissue engineering bone composed of chitosan and osteo-induced bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Chin Med J*. 2014;127:322-328.

Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J*. 2008;95:4013-4024.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater* 1971;5:117-41.

- Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487-1510.
- Hench LL; West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Rep.* 1996;13:187-241.
- Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81:1705-1728.
- Hench LL, Polak JM, Xynos ID, Buttery LDK. Bioactive materials to control cell cycle. *Mater Res Innovations* 2000;3:313-323.
- Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295:1014-1017.
- Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004;15:543-562.
- Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17:967-967.
- Hench LL. Chronology of bioactive glass development and clinical applications. *New J Glass Ceram* 2013;3:67-73.
- Hench LL, Roki N, Fenn MB. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. *J Mol Struc.* 2014;1073:24-30.
- Hench LL. The future of bioactive ceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26:86.
- Hench LL, Jones JR. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:194.
- Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Flow Perfusion Culture of Marrow Stromal Cells Seeded on Seeding Osteoblastic Cells into a CaP/PLGA Scaffold 493 Porous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics. *Ann Biomed Eng.* 2005; 33:1238-1248.
- Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering Threedimensional Bone Tissue in vitro Using Biodegradable Scaffolds: Investigating Initial Cell seeding Density and Culture Period. *J Biomed Mater Res.* 2000;51: 376-382.
- Hoppe A, Gueldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757-2774.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7:393-395.

Hum J, Boccaccini AR. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23:2317-2333.

Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, Iwasaki M, Sunamura S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Saito K, Nakamura T, Siomi H, Ito H, Arai Y, Shinomiya K, Takeda S. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:20794-20799.

Jell G, Notingher I, Tsigkou O, Notingher P, Polak JM, Hench LL, Stevens MM.. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J Biomed Mater Res Part A* 2008;86:31-40.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*. 2002;298:1911-1912.

Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials*. 2007;28:1653-1663.

Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2013;9:4457-4486

Kalajzic I, Braut A, Guo D, Jiang X, Kronenberg MS, Mina M, Harris MA, Harris SE, Rowe DW. Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone*. 2004;35:74-82.

Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G and Delany AM: miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem*. 2010;285:25221–25231.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26:5474-5491.

Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132:533-546.

Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Böhner M, Richter W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.* 2008;4:1904-15.

Kaur G, Pandey OP, Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102:254-274.

Kido HW, Oliveira P, Parizotto NA, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl-Filho O, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro DA, Rennó AC. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass-ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101:667-673.

Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Parizotto NA, de Castro CA, Crovace MC, Rodrigues AC, Zanotto ED, Peitl Filho O, de Freitas Anibal F, Rennó AC. Porous bioactive scaffolds: characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26:74.

Kirkpatrick JC, Fuchs S, Iris Hermanns M, Peters K, Unger RE. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials.* 2007;28:5193-5198.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, 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.* 1997;89:755-764.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010; 339:189-195

Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics.* 2007;12;8:70.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920-926.

Langer R, Vacanti JP. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016;51:8-12.

- Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS. A microRNA signature for a BMP2- induced osteoblast lineage commitment program. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 2008; 105:13906-13911.
- Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 Depletion Decreases Bone Mineralization In Vivo: An FTIR Imaging Analysis. *J Bone Miner Res*. 2006;20: 2169–2177.
- Liu Y, Watanabe H, Nifuji A, Yamada Y, Olson EN, Noda M. Overexpression of a single helix-loop-helix-type transcription factor, scleraxis, enhances aggrecan gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells. *J Biol Chem* 1997;272:29880-29885.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2002;62:1-13.
- Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. 2005;9:72-84.
- Lopes HB, Ferraz EP, Gonçalves AL, Florio P, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Participation of MicroRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;17:1-21.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
- Lu W, Ji K, Kirkham J, Yan Y, Boccaccini AR, Kellett M, Jin Y, Yang XB. Bone tissue engineering by using a combination of polymer/Bioglass composites with human adipose-derived stem cells. *Cell Tissue Res*. 2014;356:97-107.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4:415-428.
- Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1:31-37.

Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988;254:317-330.

Martins CS, Ferraz EP, De Castro-Raucci LM, Teixeira LN, Maximiano WM, Rosa AL, De Oliveira PT. Changes in actin and tubulin expression in osteogenic cells cultured on bioactive glass-based surfaces. *Microsc Res Tech.* 2015;78:1046-1053.

Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2009;24:398-410.

Matsumoto MA, Caviqioli G, Bigueti CC, Holgado Lde A, Saraiva PP, Rennó AC, Kawakami RY. A novel bioactive vitroceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23:1447-1456.

Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials.* 2003;24:2303-2308.

McGee-Russell SM. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1958;6:22-42.

Millan JL. The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2013;93:299-306.

Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012;91:736-744.

Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368:267-272.

Moorthi A, Vimalraj S, Avani C, He Z, Partridge NC, Selvamurugan N. Expression of microRNA-30c and its target genes in human osteoblastic cells by nano-bioglass ceramic-treatment. *Int J Biol Macromol.* 2013;56:181-185.

Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a users guide. *Stem Cells Dev.* 2010;19:1449-1470.

Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A*. 2007;82:545-557.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002. 11;108:17-29.

Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, Kumta PN, Sfeir C. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007;28:1267-1279.

Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:1263-1278.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610.

Peitl-Filho O, Zanotto ED, Hench LL. Bioactive ceramics and method for preparing bioactive ceramics, Patent WO 97/41079, 1997.

Peitl O, Zanotto ED, Hench LL. Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics. *J Non-Cryst Solids* 2001;292:115-126.

Peitl O, Zanotto E, Serbena FC, HenchLL. Compositional and microstructural design of highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics. *Acta Biomaterialia*. 2012;8:321-332.

Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*. 2000;18:959-963.

Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:246-255.

Reilly G, Radin S, Chen AT, Ducheyne P. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. *Biomaterials*. 2007;28:4091-4097.

Rennó AC, Bossini PS, Crovace MC, Rodrigues AC, Zanotto ED, Parizotto NA. Characterization and *In Vivo* Biological Performance of Biosilicate. *Biomed Res Int*. 2013;2013:141427.

Roden RD. Principles of bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010;22:295-300.

Rosa AL, Beloti MM. TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells. *J Cell Biochem*. 2003;89:1148-1153.

Rosa AL, de Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2008;5:719-728.

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha1\beta1$ integrin signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2014;115:540-548.

Roosa SM, Kemppainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92:359-368.

Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, de Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:148-155.

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

Santos TS, Abuna RFP, Lopes HB, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. *Regen Med*. 2015;10:127-133.

Santos TS, Abuna RP, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal Stem Cells Repress Osteoblast Differentiation Under Osteogenic-Inducing Conditions. *J Cell Biochem*. 2015;116:2896-2902.

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002;20:530-541.

Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res* 2002;59:340-348.

Schepers E, Barbier L, Ducheyne P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:655-665.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012;9:671-675.

Sicchieri, LG. Engenharia de tecido ósseo: avaliações in vitro e in vivo do biomaterial híbrido ácido poli-láctico-co-glicólico/fosfato de cálcio e células osteoblásticas derivadas de células-tronco. Ribeirao Preto, 2010.

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

Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of Threedimensional Cell/Polymer Constructs for Bone Tissue Engineering in a Spinner Flask and a Rotating Wall Vessel Bioreactor. *J Biomed Mater Res*. 2005;62:136-148.

Simão AM, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, Ciancaglini P. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell Biol Int*. 2007;31:1405-1413.

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

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7:1918-1929.

St John HC, Bishop KA, Meyer MB, Benkusky NA, Leng N, Kendzierski C, Bonewald LF, Pike JW. The osteoblast to osteocyte transition: epigenetic changes and response to the vitamin D3 hormone. *Mol Endocrinol* 2014;28:1150-1165.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 1993;14:424-442.

Straub JA, Sholler GL, Nishi R. Embryonic sympathoblasts transiently express TrkB in vivo and proliferate in response to brain-derived neurotrophic factor in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007;7:10.

Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo RO. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials.* 2016;83:363-382.

Tevlin R, McArdle A, Atashroo D, Walmsley GG, Senarath-Yapa K, Zielins ER, Paik KJ, Longaker MT, Wan DC. Biomaterials for craniofacial bone engineering. *J Dent Res.* 2014;93:1187-1195.

Todeschi MR, El Backly R, Capelli C, Daga A, Patrone E, Introna M, Cancedda R, Mastrogiacomo M. Transplanted Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Modify the In Vivo Microenvironment Enhancing Angiogenesis and Leading to Bone Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2015;24:1570-1581.

Tripathi A, Murthy PSN, Keshri G, Singh MM. Tissue Engineered Osteogenesis in Bone Defects by Homologous Osteoblasts Loaded on Sterile Bioresorbable Coral Scaffold in Rabbits. *Surgical Science.* 2011;2:369-375.

Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem.* 1997;121:317-324.

Twine NA, Chen L, Pang CN, Wilkins MR, Kassem M. Identification of differentiation-stage specific markers that define the ex vivo osteoblastic phenotype. *Bone* 2014;67:23-32.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35. pii: e00191.

Wang W, Liu Q, Zhang Y, Zhao L. Involvement of ILK/ERK1/2 and ILK/p38 pathways in mediating the enhanced osteoblast differentiation by micro/nanotopography. *Acta Biomater.* 2014;10:3705-3715.

Woodard JR, Hildore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, Clark SG, Wheeler MB, Jamison RD, Wagoner Johnson AJ. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007;28:45-54.

Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res.* 2001;58:270-276.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000a;276:461–465.

Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int.* 2000b;67:321-329.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;55:151–157.

Yuan H, de Bruijn JD, Zhang X, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5). *J Biomed Mater Res.* 2001;58:270-276.

Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron.* 2005;36:583-592.

Zaky SH, Cancedda R. Engineering craniofacial structures: facing the challenge. *J Dent Res.* 2009;88(12):1077-1091.

Zhang W, Zhu C, Ye D, Xu L, Zhang X, Wu Q, Zhang X, Kaplan DL, Jiang X. Porous silk scaffolds for delivery of growth factors and stem cells to enhance bone regeneration. *PLoS One.* 2014;9:e102371.

Zanotto ED, Ravagnani C, Peitl O, Panzeri H, Lara EG. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments, Patent WO 2004074199 A1, 2007.

Zhu, Y.; Lui, T.; Song, K.; Fan, X.; Ma, X.; Cui, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 2008;26:664-675.

ANEXO A

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 13.1.154.53.3), intitulado "Engenharia de Tecidos: efeito da associação entre células e BIO-SCA sobre o reparo de defeitos ósseos", de autoria de **Emanuela Prado Ferraz** 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 1º. 04.2013.

Colaboradores: Marcos Mateus Beloti;
Paulo Tambasco de Oliveira;
Murilo Crovace;
Oscar Peiti Filho

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.154.53.3), entitled: "Engenharia de Tecidos: efeito da associação entre células e BIO-SCA sobre o reparo de defeitos ósseos", by **Emanuela Prado Ferraz** 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, April, 1st 2013.

Ribeirão Preto, 10 de abril 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

Castro-Raucci LMS; Francischini MS, Teixeira LN, **Ferraz EP**, Lopes HB, de Oliveira PT, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation by Regulating Endogenous Bone Morphogenetic Protein Expression and Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016;117:1718-1726.

Albano MP, Calambás-Pulgarin HL, Garrido LB, **Ferraz EP**, Rosa AL, de Oliveira PT. Effect of ZrO₂ content on ageing resistance and osteogenic cell differentiation of ZrO₂-Al₂O₃ composite. *Ceramics International*. 2016;42:11363-11372.

Lopes HB, **Ferraz EP**, Almeida AL, Florio P, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Participation of MicroRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2016;30:1-11.

Martins CS, **Ferraz EP**, De Castro-Raucci LM, Teixeira LN, Maximiano WM, Rosa AL, De Oliveira PT. Changes in actin and tubulin expression in osteogenic cells cultured on bioactive glass-based surfaces. *Microsc Res Tech*. 2015;78:1046-53.

Ferraz EP, Rosa AL, de Oliveira PT, Santos TS, Reino DM, Pontes CB, Xavier SP. Clinical, Histological and Cellular Evaluation of Vertico-Lateral Maxillary Reconstruction Associating Alveolar Osteogenic Distraction and Fresh-Frozen Bone Allograft. *J Oral Implantol*. 2015;41:326-31.

Heair HM, Kemper AG, Roy B, Lopes HB, Rashid H, Clarke JC, Afreen LK, **Ferraz EP**, Kim E, Javed A, Beloti MM, MacDougall M, Hassan MQ. MicroRNA 665 Regulates Dentinogenesis through MicroRNA-Mediated Silencing and Epigenetic Mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2015;35:3116-3130.

Ferraz EP, Sverzut AT, Freitas GP, Sá JC, Alves C Jr, Beloti MM, Rosa AL. Bone tissue response to plasma-nitrided titanium implant surfaces. *J Appl Oral Sci*. 2015;23:9-13.

Ferraz EP, Xavier SP, Azevedo FG, de Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of autogenous and fresh-frozen bone grafts on osteoblast differentiation. *J Dent*. 2015 Jan;43:110-116.

Kato RB, Roy B, De Oliveira FS, **Ferraz EP**, De Oliveira PT, Kemper AG, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. *J Cell Physiol*. 2014;229:1690-1696.

Ferraz EP, Xavier SP, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Mandibular symphysis and ramus as sources of osteoblastic cells for bone tissue engineering. *Oral Dis*. 2014;20:e31-5

2. Artigos enviados para publicação

Ferraz EP, Crovace MC, Peitl Filho O, Znotto ED, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Osteogenic and osteoinductive potentials of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) with two crystalline phases. Enviado para *Acta Biomaterialia*.

Ferraz EP, de Oliveira PT, Oliveira FS, Crovace MC, Peitl Filho O, Beloti MM, Rosa AL. Bioactive glass-based surfaces induce differential gene expression profiling of osteoblasts. Enviado para o *J Biomedical Materials Research*.

Martins Jr, W, **Ferraz EP**, Beloti MM, Rosa AL, Rosa JCM. Immediate Dentoalveolar Restoration Technique (IDR) - Autograft Characterization and a Case Report. Enviado para o *Implant Dentistry*.

Silva ER, **Ferraz EP**, Xavier SP. Volumetric Stability of Fresh Frozen Bone Blocks in Atrophic Posterior Mandible Augmentation. Enviado para o *Journal of Oral Implantology*

3. Resumos publicados em anais de congressos

Castro-Raucci LMS; Francischini MS, Teixeira LN, **Ferraz EP**, Lopes HB, de Oliveira PT, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation mediated by Endogenous BMP 2-4. 10th Word Biomaterial Congress, 2016, Montreal. Abstracts flip ebook, 2016:1.

Lopes HB, **Ferraz EP**, Almeida AL, Florio P, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM.. Participation of microRNA-34a/RANKL in the osteogenic potential of the Poly(vinylidene-trifluorethylene)/barium titanate membrane. 2016 European Calcified Tissue Society. 2016, Roma. Bone Abstracts, 2016:5,152.

Ferraz EP, Almeida AL, Freitas GP, Crovace MC, Peitl Filho O, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa A. In vitro and In vivo evaluations of a Bioactive glass scaffold (Bio-Sca) for bone

regeneration. In: IV International Conference on Tissue Engineering, 2015, Lisboa, Portugal. Book of Abstracts. Lisboa, Portugal: ECCOMAS, 2015;56:56.

Ferraz EP, Hassan MQ, de Olivera PT, Crovace MC, Peitl-Filho O, Beloti MM, Rosa AL. The differential expression of osteogenesis-related microRNAs induced by bioactive glass-ceramic in osteoblasts. 2015 Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, 2015. San Diego. 2015 Cell Biology Poster Guide, 2015;1:666.

Ferraz EP, Freitas GP, Crovace MC, Peitl Filho O, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa. A novel bioactive glass-ceramic scaffold for bone tissue engineering. In: XIV Brazil Material Research Society Meeting, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil Material Research Society Meeting, 2015;1:1998

Lopes HB, **Ferraz EP**, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM.. Large-scale analysis of microRNA expression in newly formed bone in contact with poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite. In: XIV Brazil Material Research Society Meeting, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil Material Research Society Meeting, 2015;1:1900.

Oliveira MV, Ribeiro HT, Balestra RM, Andrade MC **Ferraz EP**, de Oliveira PT, Rosa AL. Characterization and In vitro test of calcium phosphate coatings on porous titanium substrates. In: XIV Brazil Material Research Society Meeting, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil Material Research Society Meeting. 2015;1:2018-2019.

Ferraz EP, Almeida AL, Freitas GP, Crovace MC, Peitl Filho O, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa. Effect of bioactive glass scaffold combined with mesenchymal stem cells or osteoblasts on bone repair. In: World Conference on Regenerative Medicine 2015, 2015, Leipzig. Regenerative Medicine, 2015;10:148-149.

Ferraz EP, Crovace MC, Peitl Filho O, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa A.. Osteogenic potential of bioactive glass-ceramic surfaces. In: 8th COLAOB, 2014, Rosario. 8th COLAOB, 2014;1:76.

Freitas GP; **Ferraz EP**, Sverzut AT, Alves Juniro C, Rosa AL. Osseointegration of Titanium dental Implants with plasma nitriding surfaces. In: AAOMS 95th annual meeting, 2013, Orlando - FL. Journal of oral and maxillofacial surgery, 2013; 71:56.

Ferraz EP, Xavier SP, Beloti MM, Rosa AL, Sousa SLS. Proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on collagen membranes. In: XII Brazilian Materials Research Society

Meeting, 2013, Campos do Jordão. XII Brazilian Materials Research Society Meeting-Program Booking, 2013;1p:106.

Ferraz EP, Alves OC, de Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Osteoblastic differentiation of cells cultured on distinct glass-based substrates. In: 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology,, 2013, New Orleans. 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2013;1:250.