UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ALANN THAFFARELL PORTILHO DE SOUZA

**Avaliação do efeito da terapia celular com osteoblastos
na regeneração do tecido ósseo**

RIBEIRÃO PRETO
2017

ALANN THAFFARELL PORTILHO DE SOUZA

**Avaliação do efeito da terapia celular com osteoblastos
na regeneração do tecido ósseo**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

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

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto
2017

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

Souza, Alann Thaffarell Portilho de

Avaliação do efeito da terapia celular com osteoblastos na regeneração do tecido ósseo. Ribeirão Preto, 2017.

73 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) 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. tecido ósseo; 2. osteoblasto; 3. terapia celular; 4. medicina regenerativa; 5. crista neural; 6. mesoderma

FOLHA DE APROVAÇÃO

Souza, Alann Thaffarell Portilho de

Avaliação do efeito da terapia celular com osteoblastos na regeneração do tecido ósseo

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovado 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, de Histologia e no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu guia diante de todas as situações e pelas inúmeras bênçãos em mim derramadas, permitindo que eu realizasse esse sonho como pedi a Ele.

À Nossa Senhora de Nazaré, por ser minha “fonte de amor e de fé”.

Aos meus pais, Liduina Portilho de Souza e Suzivaldo Oliveira de Souza (*in memorian*), pelo amor incondicional, pela educação exemplar e por darem as condições necessárias para que conquistasse meus objetivos. À ela, especialmente, pelo exemplo de perseverança e força em meio a todos os obstáculos que enfrentou e venceu.

À minha irmã, Anna Thanny, pelo amor e carinho e ao Théo, que ainda nem chegou e já faz os meus dias serem melhores.

À Vovó Marly, por ter sido pai e mãe durante grande parte de minha vida.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por ter aceitado ser meu orientador e permitir que eu faça parte do seu seletivo grupo de alunos, acreditando no meu potencial; por ser um exemplo de profissional e dedicação à pesquisa; pelos ensinamentos transmitidos; pela amizade, compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pelas várias oportunidades que têm me dado no âmbito acadêmico e pessoal; pelas palavras de motivação e incentivo, que fazem com que eu busque melhorar sempre; por toda ajuda oferecida; por ser um grande amigo que ganhei em Ribeirão Preto.

Aos Professores da Pós-Graduação, Prof. Dr. Alexandre Trivellato, Prof. Dr. Cássio Sverzut, Prof. Dr. Samuel Xavier e Prof. Dr. Valdemar Barros pelo aprendizado.

Ao Gileade e Helena, pela receptividade quando entrei no Mestrado; por estarem sempre dispostos a me ajudar e ensinar; pelo companheirismo de sempre e por serem meus grandes amigos em Ribeirão Preto.

À Manu e ao Rogério pela amizade, principalmente nesse último ano em que fiquei “sozinho” em Ribeirão Preto. À ela, agora Professora, por sempre me ajudar quando precisei.

Aos alunos de Iniciação Científica, Barbara, Julia, Pedro e Denise por permitirem que eu colaborasse com seus trabalhos, contribuindo para minha

formação.

Aos amigos da Pós-Graduação Patrick, Guilherme, Erik, Rafael, Maysa, Felipe e Sandro pela companhia nas clínicas e disciplinas.

Aos amigos de laboratório e bancada Rodrigo, Rayana, Paula, Adriana, Simone, Leonardo, Patrícia e Ana Luísa pela companhia diária e troca de experiências.

Ao Roger, Fabíola, Adriana, pela amizade, paciência e dedicação em todos os ensinamentos envolvendo cultura de células, biologia molecular e microtomografia.

Ao Gustavo, Milla, Paulo, Dimitrius e Fabiana pelo auxílio em etapas desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro essencial para a execução deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e funcionários pela infraestrutura e auxílio.

À Paula Pessoa; meu orgulho e exemplo de caráter e honestidade; por fazer eu me tornar uma pessoa melhor a cada dia; por ser minha companheira fiel e compartilhar junto comigo os melhores momentos e experiências da vida; pelo amor e carinho constante que fazem com que tudo se torne melhor.

“Para tudo há uma ocasião, e um tempo para cada propósito debaixo do céu”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

SOUZA, A. T. P. Avaliação do efeito da terapia celular com osteoblastos na regeneração do tecido ósseo. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2017. 73 p.

Apesar do grande potencial de regeneração do tecido ósseo, em algumas situações a extensão da lesão impede que o tecido se repare completamente. Como uma alternativa em relação aos tratamentos convencionais, a terapia celular tem sido considerada como promissora para o reparo de defeitos ósseos. No entanto, poucos estudos investigaram a terapia celular utilizando osteoblastos, portanto, avaliamos o efeito da injeção direta de osteoblastos na regeneração do tecido ósseo. Como os osteoblastos têm origens embrionárias diferentes, foi comparado *in vitro* o potencial osteogênico de osteoblastos derivados da crista neural, do mesoderma e de ambas as origens embrionárias. Considerando a necessidade de grande número de células para a terapia, foi comparado o efeito de uma subcultura, como meio de aumentar a quantidade de células, no potencial osteogênico dos osteoblastos. Para avaliação da regeneração dos defeitos, osteoblastos foram injetados diretamente nesses defeitos. Osteoblastos foram obtidos da calvária de ratos recém-nascidos (Wistar), sendo que os derivados da crista neural foram isolados dos ossos frontais (OB-CN); os do mesoderma isolados dos ossos parietais (OB-MS); e de ambas as origens embrionárias isolados de toda a calvária (OB-Cal). O efeito da subcultura no potencial osteogênico foi avaliado em OB-Cal ou na primeira passagem dessa cultura (OB-Cal P1). Após até 14 dias em cultura, foram avaliadas a proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz extracelular mineralizada e a expressão dos genes marcadores osteoblásticos: fator de transcrição “runt-related” 2 (RUNX2), ALP, osteocalcina (OC) e sialoproteína óssea (BSP). Para avaliar a regeneração do tecido ósseo, foram criados defeitos de 5 mm de diâmetro na calvária de ratos Wistar, que após 2 semanas foram tratados com 5×10^6 osteoblastos derivados de OB-Cal P1, por meio de injeção local. Ao final de 4 semanas, a formação óssea foi avaliada por microtomografia computadorizada e análise

histológica. Os dados foram comparados por ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls, ou teste t, quando apropriado, considerando o nível de significância de 5%. A comparação do potencial osteogênico em relação à origem embrionária mostrou que, os OB-MS apresentaram maior proliferação mas não houve diferença entre as culturas no evento final da diferenciação osteoblástica, que é a formação de matriz mineralizada. No entanto, como as culturas de OB-Cal apresentaram maior expressão gênica de marcadores iniciais, intermediários e finais dessa diferenciação; e considerando que, essas culturas são aquelas nas quais é possível obter o maior número de células, optamos por utilizar essas culturas na avaliação da formação óssea induzida pela terapia celular. Além disso, os resultados mostraram que os OB-Cal P1 tem seu potencial osteogênico reduzido, mas considerando que a subcultura permite a obtenção de maior número de células, são uma boa escolha para a terapia celular. Tanto que, ao avaliar in vivo a capacidade regenerativa das OB-Cal P1 no reparo dos defeitos ósseos, as análises microtomográficas e histológicas mostraram que a terapia celular com injeção local de osteoblastos obtidos de fragmentos ósseos da calvária constitui uma estratégia adequada para estimular o reparo ósseo.

Palavras chave: tecido ósseo, osteoblasto, terapia celular, medicina regenerativa, crista neural, mesoderma.

ABSTRACT

SOUZA, A. T. P. Evaluation of the effect of cell therapy with osteoblasts on bone tissue regeneration. Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2017. 73 p.

Despite of the great potential of regeneration of the bone tissue, in some situations the extension of the lesion prevents the tissue from repairing completely. As an alternative to conventional treatments, cell therapy has been considered a promising strategy for the repair of bone defects. However, few studies investigated cell therapy using osteoblasts, therefore, we evaluated the effect of direct injection of osteoblasts on the regeneration of bone tissue. Since osteoblasts have different embryonic origins, the osteogenic potential of osteoblasts derived from neural crest, mesoderm and both embryonic origins was compared in vitro. Considering the need for a large number of cells for the therapy, the effect of a subculture, a common way to increase the amount of cells, on the osteogenic potential was also compared. Then, osteoblasts were injected directly into bone defects to evaluate the regeneration of bone tissue. Osteoblasts were obtained from the calvaria of newborn rats (Wistar), the neural crest derivatives were isolated from the frontal bones (OB-CN); those of the mesoderm isolated from the parietal bones (OB-MS); and from both embryonic origins isolated from the entire calvaria (OB-Cal). The effect of the subculture on the osteogenic potential was evaluated in OB-Cal and in its first-passage (OB-Cal P1). After up to 14 days, all cultures were assayed for cell proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), mineralized extracellular matrix formation and the expression of the osteoblastic marker genes: runt-related transcription factor 2 (RUNX2), ALP, osteocalcin (OC) and bone sialoprotein (BSP). To evaluate the effect of cell injection on bone regeneration, defects of 5 mm diameter were created in the calvaria of Wistar rats, that after 2 weeks were injected with 5×10^6 OB-Cal P1-derived osteoblasts. Vehicle injections were used as control. At the end of 4 weeks, the bone formation was evaluated by computerized microtomography and histological analysis. Data were compared by ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test, or t-

test, when appropriate, and the level of significance was set at 5%. The comparison of the osteogenic potential related to the embryonic origin showed that the OB-MS presented a greater proliferation but there was no difference between the cultures in the final event of the osteoblastic differentiation, that is the formation of mineralized matrix. However, as OB-Cal cultures showed greater gene expression of initial, intermediate and final markers of this differentiation; and considering that these cultures are those in which it is possible to obtain the largest number of cells, we selected these cultures for evaluating the bone formation induced by the cell therapy. In addition, the results showed that OB-Cal P1 still holds its osteogenic potential and despite being lower than that of OB-Cal as the subculture allows obtaining more cells, it has been considered as a good choice for cell therapy. In agreement with this, OB-Cal P1-derived osteoblasts injected into the bone defects were capable of inducing more bone formation than control, as revealed by microtomographic and histological analyzes. Therefore, it supports the idea that cell therapy with local injection of osteoblasts obtained from calvarial bone fragments is an adequate strategy to stimulate bone formation.

Keywords: bone tissue, osteoblast, cell therapy, regenerative medicine, neural crest, mesoderm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proliferação de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS) crescidos sobre poliestireno aos 3, 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._37

Figura 2. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), crescidos sobre poliestireno aos 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____38

Figura 3. Matriz extracelular mineralizada produzida por osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS) crescidos sobre poliestireno por 14 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____39

Figura 4. Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), aos 3, 7 e 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 5. Expressão relativa dos genes marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), ALP (B), OC (C) e BSP (D) de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase (GAPDH) e calibrados em relação à expressão dos genes de OB-Cal aos 3 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=3)._____41

Figura 6. Proliferação de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____42

Figura 7. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____43

Figura 8. Matriz extracelular mineralizada produzida por osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 14 dias, e sua quantificação. Asterisco (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste T, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5)._____44

Figura 9. Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1), aos 3, 7 e 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._____44

Figura 10. Expressão relativa dos genes marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), ALP (B), OC (C) e BSP (D) de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene

constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH e calibrados em relação à expressão dos genes de OB-Cal aos 3 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=3)._____46

Figura 11. Imunofenotipagem de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) cultivados por 7 dias. Os histogramas mostram células que não foram incubadas com o anticorpo (A), utilizadas como controle para as marcações, assim como ausência relativa de expressão de MHC Classe I e II (B e C). Os números indicam a porcentagem de OB-Cal P1 marcados com os anticorpos (D). Adicionalmente observa-se o controle negativo e os controles positivos para os anticorpos MHC classe I e II (E, F e G). Os números indicam a porcentagem de partículas κ marcadas com os anticorpos (H)._____47

Figura 12. Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A e B) de defeitos ósseos criados em calvária de ratos, tratados com injeção de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) (A) ou veículo sem células (Controle) (B), ao final de 4 semanas. _____48

Figura 13. Parâmetros morfométricos obtidos após a reconstrução microtomográfica de tecido ósseo formado em defeitos ósseos criados nas calvárias de ratos, tratados com injeção de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) ou de veículo sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa (Teste T, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=12)._____49

Figura 14. Fotomicrografias de defeitos ósseos criados em calvária de ratos, após injeção de de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) (A, C e E) ou de veículo sem células (Controle) (B, D e F), ao fim de 4 semanas. Defeitos injetados com OB-Cal P1 (A) exibiram maior formação óssea em comparação com o Controle (B). A área de formação óssea nos defeitos injetados com OB-Cal P1 (C) se estendeu em direção ao

centro do defeito, enquanto que no Controle (D), uma pequena área de formação óssea se restringiu às margens do defeito. Em ambos os defeitos injetados com OB-Cal P1 e Controle, observa-se tecido ósseo maduro com lamelas organizadas e paralelas entre si (C e D), tecido ósseo imaturo (E e F), além de osteoblastos organizados em camada na superfície óssea (E e F; insertos). Os detalhes histológicos descritos estavam presentes em todos os defeitos ósseos, independentemente do tipo de tratamento (OB-Cal P1 ou Controle). Hematoxilina e Eosina. tol: tecido ósseo lamelar; toi: tecido ósseo imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A e B = 800 μm ; C e D = 200 μm ; E e F: 100 μm ; insertos: 50 μm . _____ 50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVO GERAL	25
2.1. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Experimentos In Vitro	27
3.1.1. Obtenção e Cultura de Osteoblastos	27
3.1.2. Proliferação Celular	28
3.1.3. Medida da Atividade de ALP	29
3.1.4. Medida do Conteúdo de Proteína Total	29
3.1.5. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada	30
3.1.6. Expressão de Genes Marcadores Osteoblásticos	30
3.1.7. Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II)	32
3.2. Experimentos In Vivo	33
3.2.1. Procedimento Cirúrgico para Criação dos Defeitos Ósseos	33
3.2.2. Tratamento dos Defeitos Ósseos	34
3.2.3. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos	34
3.2.3.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica	34
3.2.3.2. Análise Histológica	35
3.3. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Proliferação Celular de OB-Cal, OB-CN e OB-MS	37
4.2. Medida da Atividade de ALP de OB-Cal, OB-CN e OB-MS	37
4.3. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada de OB-Cal, OB-CN e OB-MS	38
4.4. Avaliação da Integridade do RNA Total de OB-Cal, OB-CN e OB-MS	39

4.5. Expressão dos Genes Marcadores Osteoblásticos de OB-Cal, OB-CN e OB-MS	40
4.6. Proliferação Celular de OB-Cal e OB-Cal P1	42
4.7. Medida da Atividade de ALP de OB-Cal e OB-Cal P1	42
4.8. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada de OB-Cal e OB-Cal P1	43
4.9. Avaliação da Integridade do RNA Total de OB-Cal e OB-Cal P1	44
4.10. Expressão de Genes Marcadores Osteoblásticos de OB-Cal e OB-Cal P1	45
4.11. Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classe I e II) em OB-Cal P1	46
4.12. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos	47
4.12.1. Análise Microtomográfica	47
4.12.2. Análise Morfométrica	48
4.12.3. Análise Histológica	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui uma notável capacidade de regeneração e reparo como parte da remodelação fisiológica ou em resposta a lesões, como traumas e processos patológicos. Entretanto, em algumas situações, a reparação óssea pode não ocorrer adequadamente por inúmeros fatores. Dentre eles, devido à problemas sistêmicos, condições adversas locais (lesão vascular, infecção, etc.); defeitos ósseos de tamanho crítico (quando a extensão do dano ultrapassa a capacidade de regeneração do tecido); ou pela combinação desses fatores. Vários tratamentos têm sido descritos para solucionar esse problema, incluindo o emprego de enxertos, biomateriais, terapia celular e engenharia de tecido ósseo (Khan et al., 2005; Rosa et al., 2008; Brydone et al., 2010; Zheng et al., 2012).

O enxerto autógeno permanece como padrão ouro em enxerto ósseo. Somente ele apresenta as propriedades ideais que um enxerto ósseo deve possuir, que são: osteocondução (matriz), osteoindução (fatores de crescimento) e osteogênese (células osteogênicas ou osteoprogenitoras) (Khan et al., 2005; Marx, 2007). Contudo, o uso de enxertos ósseos autógenos está associado a problemas como necessidade de mais de uma área cirúrgica, grande potencial de morbidade e quantidade limitada. Enquanto que, enxertos alógenos, apesar de contornar algumas das questões em relação aos enxertos autógenos, também apresentam algumas desvantagens, tais como: risco de transmissão de doenças infecciosas, perda de propriedades biológicas e mecânicas devido à sua transformação e alto custo (Younger, Chapman, 1989; Kappe et al., 2010; Zwingenberger et al., 2012). Os enxertos xenógenos, representados principalmente pelo osso bovino, constituem o mais bem documentado substituto ósseo na literatura. O tratamento para remoção da parte orgânica, que praticamente elimina sua antigenicidade, gera uma estrutura semelhante ao osso medular humano, com alto potencial osteocondutor. No entanto, eles não apresentam potencial osteoindutor e osteogênico (Kao, Scott, 2007; Zizzari et al., 2016; Chavda, Levin, 2017). Dessa forma, existe um contínuo interesse no desenvolvimento de novas terapias para se obter o reparo do tecido ósseo e, dentre elas, estratégias de

medicina regenerativa baseadas no uso de células e biomateriais têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa.

A terapia celular e engenharia de tecidos com base na utilização de células e/ou biomateriais têm sido amplamente investigados em diversas áreas da saúde, como Odontologia e Medicina, com o objetivo de reparar defeitos ósseos. A engenharia de tecidos é definida como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios das ciências biológicas e engenharia para desenvolver substitutos com o objetivo de reparar, manter ou melhorar a função dos tecidos”, usando arcabouços, fatores de crescimento e células (Langer, Vacanti, 1993; Rosa et al., 2008). A Sociedade Americana de Gene e Terapia Celular descreve terapia celular como a “administração de células para tratar uma doença genética ou adquirida”. A origem das células pode ser do mesmo indivíduo (autóloga), ou de outro indivíduo (alogênica). As estratégias envolvem a aplicação de células-tronco e células mais ou menos maduras, diferenciadas in vitro (American Society of Gene and Cell Therapy, 2017).

A literatura ainda é divergente quanto ao tipo celular ideal e vários tipos de células têm sido investigados, baseados na facilidade de obtenção, isolamento e expansão das mesmas, além de sua capacidade de diferenciação em células do tecido ósseo (Amini et al., 2012). Nesse sentido, através da engenharia de tecidos como estratégia para reparar defeitos ósseos criados em calvária de ratos, nosso grupo de pesquisa tem investigado a combinação de células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea e tecido adiposo, indiferenciadas ou induzidas à diferenciação osteoblástica, com diferentes arcabouços (Beloti et al., 2012; Santos et al., 2015; Ferraz et al., 2017; Freitas et al., 2017). Apesar de ocorrer formação óssea, nenhuma dessas investigações mostrou haver o reparo completo dos defeitos, o que em parte, pode ser devido ao comportamento biológico dos carreadores que podem ser degradados de forma não previsível ou atraírem células gigantes multinucleadas.

Portanto, optamos por abandonar o uso de biomateriais e avaliar a terapia celular por meio de injeções diretamente nos defeitos de calvária de ratos de células-tronco mesenquimais de medula óssea ou de tecido adiposo, ambas indiferenciadas ou induzidas à diferenciação osteoblástica, com alguns

resultados preliminares bastante promissores (Freitas et al., 2016; Minari et al., 2016).

Embora menos estudados em comparação com células indiferenciadas, osteoblastos também podem ser considerados para utilização na terapia celular. Essas células podem ser isoladas de diferentes tecidos e por diferentes métodos, mas possuem a capacidade de se expandir *in vitro* e expressar marcadores osteoblásticos como a fosfatase alcalina, proteínas colágenas, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (Jonsson et al., 1999; Siggelkow et al., 1999; De Oliveira et al., 2003; De Oliveira, Nanci, 2004).

São observadas diferenças significativas entre células-tronco mesenquimais e osteoblastos obtidos de fragmentos ósseos de um mesmo doador e entre osteoblastos obtidos de diferentes sítios ósseos, mesmo assim, essas populações celulares são capazes de exibir o fenótipo osteoblástico e induzir a mineralização da matriz extracelular (Jonsson et al., 1999; Ferraz et al., 2014). Sendo assim, até o momento, a literatura é incipiente em relação à capacidade que osteoblastos obtidos diretamente do tecido ósseo, possuem em regenerar defeitos ósseos. Ainda menos exploradas são as possíveis diferenças de potencial osteogênico e diferenciação atribuídas a osteoblastos provenientes de diferentes origens embrionárias.

A calvária dos mamíferos é constituída por uma variedade de ossos que se formam através do processo de ossificação intramembranosa e assim como as estruturas craniofaciais, possui desenvolvimento misto, o que reflete sua origem evolutiva mista (Morris-Kay, 2001; Jiang et al., 2002). As origens embrionárias dos ossos da calvária com as suturas associadas não eram bem compreendidas, até que se utilizou um modelo de camundongo transgênico Wnt1-Cre para identificar estruturas craniofaciais com origem da crista neural (Jiang et al., 2002). A mesma estratégia foi utilizada, desta vez em camundongos Wnt1-Cre e Msp1-Cre, para mapear as células de origem da crista neural e do mesoderma (Yoshida et al., 2008). Portanto, o osso frontal e o parietal surgem a partir de dois tecidos embrionários, o primeiro é derivado da crista neural e o segundo, do mesoderma (Chai et al., 2000; Jiang et al., 2002).

A crista neural é uma população de células exclusivamente encontradas em embriões de vertebrados e na região craniofacial dão origem às estruturas

mesenquimais, como tecidos neurais, ossos, dentes e cartilagem (LaBonne, Bronner-Fraser, 1999; Chai et al., 2000; Chai, Maxson, 2006).

A distribuição de células da crista neural e mesoderma na calvária em desenvolvimento, tem importantes implicações funcionais. As suturas coronais e sagitais que constituem os dois principais centros de crescimento, são locais em que há interação entre essas células. Em parte, devido a isso, os padrões de crescimento não são uniformes nas diferentes suturas dos ossos da calvária dos mamíferos. Em ratos, por exemplo, as bordas dos ossos frontais mostram uma ampla área de proliferação celular, ao contrário da discreta proliferação observada nos ossos parietais (Iseki et al., 1997).

As diferenças na origem do tecido embrionário podem resultar em um potencial osteogênico e capacidade de regeneração tecidual variáveis, como demonstrado em camundongos através da realização de estudos *in vitro* e *in vivo*, em que os osteoblastos com origem da crista neural (osso frontal), mostraram potencial osteogênico superior quando comparados com os osteoblastos de origem mesodérmica (osso parietal). Além disso, observou-se que o osso frontal exibe maior capacidade regenerativa comparado com o osso parietal (Quarto et al., 2010; Li et al., 2015).

Na busca de fonte de células para a terapia celular, o conhecimento das diferenças no potencial osteogênico relacionados à origem embrionária, como de osteoblastos dos ossos frontal e parietal de mamíferos é claramente de grande interesse científico e clínico. Contudo, há pouca informação na literatura sobre as semelhanças ou diferenças de potencial osteogênico e diferenciação comparando osteoblastos de origens embrionárias distintas (crista neural e mesoderma) com osteoblastos isolados de toda a calvária, que possuem a combinação de ambas as origens embrionárias. Além disso, até o presente momento, não se avaliou a utilização de osteoblastos e sua capacidade em regenerar o tecido ósseo através do uso da terapia celular. O estabelecimento dessas semelhanças ou diferenças *in vitro* e a utilização de terapia celular *in vivo* são fundamentais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visam melhorar a regeneração óssea.

No que tange à utilização de osteoblastos para terapia celular, um obstáculo consiste na quantidade limitada de células obtidas a partir dos métodos de isolamento descritos na literatura (Peck et al., 1964; Bellows et al.,

1986; Bellows, Aubin, 1989; Jonsson et al., 1999). Uma alternativa para contornar esse problema baseia-se no uso de subculturas, permitindo a expansão e consequente aumento no número das células. No entanto, a literatura mostra que subculturas através de sucessivas passagens podem gerar modificações nas características celulares, tais como: alterações de morfologia, tamanho, taxas de crescimento, expressão proteica, capacidade de resposta a estímulos e sinalização celular (Briske-Anderson et al., 1997; Yu et al., 1997; Wenger et al., 2004). Portanto, o aumento do número de passagens leva a alterações celulares significativas, que aumentam proporcionalmente a cada passagem subsequente (Ma et al., 2013; Erac et al., 2014). Sendo assim, devido ao fato de a terapia celular requerer um alto número de células, a expansão de osteoblastos se torna necessária e vantajosa ao contornar as limitações numéricas que a fonte das células gera. Entretanto, deve-se priorizar a utilização de subculturas em passagens iniciais, com o menor número de alterações celulares possíveis.

À semelhança do que ocorre com o uso de células-tronco mesenquimais indiferenciadas ou induzidas à diferenciação osteoblástica, não se espera reação imune frente a injeção de células osteoblásticas obtidas de fragmentos ósseos e diferenciadas. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é constituído por um conjunto de moléculas que foram definidas como proteínas de superfície celular carregadas com peptídeos antigênicos e reconhecidas pelo receptor de células T (TCR) em células T, para iniciar ou propagar a imunidade adquirida (Bakela, Athanassakis, 2017). Vários estudos relataram a completa ausência ou baixa expressão de MHC classe II em osteoblastos (Skjodt et al., 1989; Khoury, Arnaud, 1993; Heinemann et al., 2000; Reyes-Botella et al., 2002, Schrum et al., 2003). Sugere-se que isso ocorra devido a indução *in vitro* pelas condições de cultura, ou pela presença de outras células estromais, como as células endoteliais, nessas culturas (Khoury, Arnaud, 1993). No entanto, devido a estimulação frente à exposição bacteriana, a expressão de MHC classe II pode aumentar significativamente (Schrum et al., 2003).

Considerando os desafios para a regeneração de defeitos ósseos que não se reparam adequadamente, como em situações clínicas de não-união de fraturas; devem ser investigados a avaliação do potencial osteogênico e

diferenciação de osteoblastos de origens embrionárias distintas, comparados com osteoblastos da calvária que possuem a combinação de ambas as origens; assim como a utilização da estratégia de terapia celular utilizando aquelas células com maior potencial osteogênico para avaliação do reparo do tecido ósseo.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a terapia celular utilizando osteoblastos no reparo do tecido ósseo.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Avaliar in vitro o potencial osteogênico de osteoblastos obtidos do osso frontal, que são originados da crista neural (OB-CN); obtidos do osso parietal, que são derivados do mesoderma (OB-MS); e de toda a calvária, que possui a combinação de ambas as origens embrionárias (OB-Cal).

2.1.2. Avaliar in vitro o efeito da subcultura de osteoblastos na manutenção do potencial osteogênico.

2.1.3. Avaliar in vivo o potencial de osteoblastos em regenerar defeitos ósseos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP (Protocolo N° 2016.668.58.0).

3.1. Experimentos In Vitro

3.1.1. Obtenção e Cultura de Osteoblastos

Ratos recém-nascidos foram decapitados com lâmina de bisturi, sem a utilização prévia de anestésico e as calvárias, removidas com a utilização de tesoura. Os osteoblastos foram obtidos de fragmentos do osso frontal (OB-CN), parietal (OB-MS) e de toda a calvária (OB-Cal), por meio de digestão enzimática sequencial, com solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies, EUA) e collagenase do tipo II 0,20% (Gibco-Life Technologies). Foram utilizadas apenas células isoladas nas 2ª e 3ª digestão, respectivamente, porque aquelas obtidas na 1ª digestão não são capazes de desenvolver formações nodulares mineralizadas (Bellows, Aubin, 1989).

As culturas celulares foram mantidas por períodos de até 14 dias e a progressão foi avaliada em microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Carl Zeiss Inc., Alemanha). As células foram cultivadas em meio de crescimento que contém meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) ou em meio osteogênico, que é o meio de crescimento suplementado com 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies) e beta-glicerolfosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas e durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

As células OB-CN, OB-MS e OB-Cal foram plaqueadas (cultura primária), na densidade de 2×10^4 células, em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated, EUA) em meio osteogênico, para posteriormente se avaliar o potencial osteogênico de cada cultura por meio dos ensaios de proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz

mineralizada e expressão dos genes marcadores de osteoblastos fator de transcrição “runt-related” 2 (RUNX2), ALP, osteocalcina (OC) e sialoproteína óssea (BSP).

Para se avaliar o efeito da subcultura sobre o potencial osteogênico utilizando os mesmos ensaios acima, OB-Cal foram cultivadas em meio de crescimento em frascos de 75 cm² até a subconfluência. Após o que, o meio de cultura foi removido e adicionada solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), 1,3 mg/mL de collagenase do tipo II (Gibco-Life Technologies) e EDTA 1 mM (Gibco-Life Technologies) para obtenção de suspensão de osteoblastos, que foram subcultivados (OB-Cal P1) em meio osteogênico na densidade de 2×10^4 células em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated).

3.1.2. Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. O MTT (Sigma-Aldrich) é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecida à 37°C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT à 10% (5 mg/mL) e incubados à 37°C por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol em 134 µL de ácido clorídrico a 0,04 N – Merck, Alemanha). As placas foram então agitadas por 5 minutos, em temperatura ambiente, para a solubilização do precipitado e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek Instruments Inc., EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os dados de proliferação celular, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos como absorbância.

3.1.3. Medida da Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada ao final de 7 e 10 dias de cultura em lisados de células, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial de acordo com as especificações do fabricante (Labtest Diagnóstica, Brasil). Para obtenção dos lisados de células, o meio de cultura dos poços foi removido e os mesmos foram lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecida à 37°C. Os poços foram preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich). As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos para promover a lise celular. Em seguida, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados em tubos de ensaio com 0,5 mL de tampão dietanolamina 0,3 M, pH 10,1, e deixados por 2 minutos a 37°C. Foi então acrescentada uma alíquota de 50 µL da amostra lisada previamente e esta solução foi mantida a 37°C por 10 minutos. Para o desenvolvimento da coloração, foram adicionados 2 mL de uma solução de Na₂CO₃ 0,09 M e NaOH 0,25 M. Uma alíquota de 150 µL de cada tubo foi transferida para uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). Em seguida a absorbância foi medida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de 590 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram corrigidos pelo padrão disponibilizado pelo fabricante e normalizados pelo conteúdo de proteína total, determinado pelo método de Lowry et al. (1951) e expressos como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.1.4. Medida do Conteúdo de Proteína Total

O conteúdo de proteína total foi medido nos mesmo lisados celulares descritos acima. Brevemente, 0,5 mL dos lisados de células utilizados para a quantificação da atividade de ALP foram transferidos para tubos de ensaio, misturados com 0,5 mL de solução de Lowry (Sigma-Aldrich) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,25 mL da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau's (Sigma-Aldrich) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Uma alíquota de 150 µL de cada tubo foi então transferida para uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em espectrofotômetro

μ Quant (BioTek Instruments Inc.) utilizando-se o comprimento de onda de 680 nm e a concentração de proteína total em mg/mL em cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina (Sigma-Aldrich).

3.1.5. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada

Aos 14 dias de cultura, foi detectada e quantificada a formação de matriz extracelular mineralizada. As células foram fixadas com formalina 10% por 24 horas, desidratadas em série crescente de álcoois (30% a 100%) e processadas para coloração com vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich), que cora em vermelho áreas de mineralização ricas em cálcio. As culturas foram fotografadas e as imagens processadas utilizando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated Inc., EUA). A quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada foi realizada pela extração do cálcio, de acordo com o método descrito previamente (Gregory et al., 2004). A cada poço foram adicionados 280 μ L de ácido acético 10% e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. Após esse período, a solução de cada poço foi homogeneizada e transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Os tubos foram incubados a 85°C por 10 minutos e transferidos para recipiente contendo gelo picado, onde permaneceram por mais 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 20 minutos e 100 μ L do sobrenadante de cada tubo transferidos para uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). Foram adicionados 40 μ L de hidróxido de amônia 10% em cada poço para neutralizar o ácido. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro μ Quant (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm. Os dados obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos como absorbância.

3.1.6. Expressão de Genes Marcadores Osteoblásticos

Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a expressão gênica de RUNX2, ALP, OC e BSP foi avaliada em todas as culturas por PCR em tempo real. Para isso, a extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda, a

partir de 1 μ L de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, Reino Unido) e a qualidade das amostras foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, as amostras do RNA total foram aliquotadas na concentração desejada, aquecidas a 70°C por 2 minutos 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.

Após isso, foi confeccionada a fita complementar de DNA (cDNA) a partir de 1 μ g de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, 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, EUA). As reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica de RUNX2, ALP, OC e BSP foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) em aparelho CFX96 (Bio Rad, EUA). As reações foram realizadas em triplicata (n=3) 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 cDNA. A reação de amplificação foi composta por: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no 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 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizado para a normalização dos níveis de

expressão dos genes avaliados. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. 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 de OB-Cal aos 3 dias.

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

Após 7 dias de cultura, OB-Cal P1 foram analisadas por citometria de fluxo no aparelho FACSCanto™ (BD Biosciences, EUA) para avaliação da expressão das moléculas do MHC Classes I e II.

As culturas de OB-Cal P1 foram tripsinizadas (Gibco-Life Technologies), a suspensão de células foi ajustada para a concentração de $3,5 \times 10^5$ células por tubo e foram incubadas, separadamente, com 0,035 µg e 0,1 µg dos anticorpos primários anti-MHC classes I e II (Abcam, EUA), respectivamente; os quais foram conjugados com Ficoeritrina (FITC). Como controle da eficiência dos anticorpos utilizou-se o kit BD™CompBeads Anti-Mouse Ig κ (BD Biosciences, EUA) de acordo com especificações do fabricante. Esse kit consiste de duas populações de micropartículas: partículas κ, as quais se ligam em qualquer imunoglobulina de cadeia leve κ de camundongo (controle positivo); e controle negativo, o qual consiste de partículas que não tem capacidade de ligação. As incubações foram realizadas por 30 minutos em ausência de luz. Em seguida, as células foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (Gibco-Life Technologies) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de solução de paraformaldeído (Merck) diluído a 2% em PBS (Gibco-Life Technologies). Os tubos foram estocados em refrigerador ao abrigo da luz, até o momento de leitura no citômetro de fluxo, onde as leituras foram feitas a cada 10 mil eventos.

3.2. Experimentos In Vivo

3.2.1. Procedimento Cirúrgico para Criação dos Defeitos Ósseos

Ratos da linhagem Wistar com 4 semanas de vida e aproximadamente 200 g de peso corporal foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos nas calvárias, com diâmetro de 5 mm. Para isso, os animais foram anestesiados com solução anestésica, Coopazine (Xilazina, Agibrands do Brasil Ltda, Brasil) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - e Dopalen (Ketamina, Agibrands) - anestésico geral - na proporção de 6 mg/kg de peso corporal de Xilazina e 75 mg/kg de peso corporal de Ketamina, injetada por via intraperitoneal. Foi também realizada analgesia pré-operatória com Flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Após tricotomia e antissepsia com solução de povidina-iodo alcoólica na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O periósteo dos ossos parietais foi descolado e o defeito, produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro, sob irrigação abundante com soro fisiológico. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral teve como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral (Gomes, Fernandes, 2011). A pele foi então suturada com fio mononylon 3-0 (Ethicon Ltda, Brasil) e os limites dos defeitos ósseos foram determinados por palpação e delimitados na pele com marcadores permanentes a fim de possibilitar sua localização para, posteriormente, realizar-se as injeções locais de células. Em seguida, os animais foram medicados com dose única de Flunixinina meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Schering, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Os ratos foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água "*ad libitum*" e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.2.2. Tratamento dos Defeitos Ósseos

Após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos na calvária, os animais foram submetidos a nova intervenção para a injeção de OB-Cal P1, obtidas como descrito acima. Para isso, os animais (n=12) foram anestesiados como descrito previamente e as células, na quantidade de 5×10^6 células em 50 μ L de veículo PBS (Gibco-Life Technologies), foram injetadas subperiostealmente com a utilização de uma agulha hipodérmica de 0,80 x 25 mm e 21-G (BD PrecisionGlide, Becton Dickinson, EUA), que foi inserida tangenciando a calota craniana de tal forma que a extremidade da agulha estivesse próxima ao centro do defeito e com o bisel voltado para a posição ventral. Como controles foram utilizados defeitos ósseos que receberam injeção de 50 μ L de veículo PBS (Gibco-Life Technologies) sem células (n=12).

Decorridas 4 semanas da injeção, os animais foram eutanasiados. Esse período foi selecionado baseado em observações anteriores utilizando o mesmo tipo de defeito ósseo (Beloti et al., 2012; Sicchieri et al., 2012; Santos et al., 2015). A eutanásia foi feita com dose excessiva de Tiopental Sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal, e as calvárias foram removidas com a utilização de discos diamantados (KG Sorensen, Medical Burs, Brasil) e fixadas em solução de formol tamponado 10% (pH=7) (Merck) por 48 horas e processadas para avaliação do tecido ósseo formado.

3.2.3. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos

3.2.3.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica

As calvárias foram escaneadas em microtomógrafo SkyScan 1172 de alta resolução (Bruker, Bélgica), operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixels com resolução de até 1 μ m selecionando uma região de interesse que abrangia os defeitos ósseos. Projeções tomográficas bidimensionais e reconstruções tridimensionais (3D) foram obtidas utilizando o software NRecon (versão 1.15.4.0, Bruker), onde é possível a movimentação e visualização dos três eixos (coronal, axial e sagital). As reconstruções, foram submetidas à análise morfométrica utilizando o software CT Analyser (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker) para obtenção dos seguintes parâmetros: volume ósseo (mm^3), volume ósseo/volume total (%),

superfície óssea (mm^2), espessura trabecular (mm), número trabecular (1/mm) e separação trabecular (mm). Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software Ctan, são preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (Parfitt et al., 1987).

3.2.3.2. Análise Histológica

Após as análises por microtomografia, as amostras de calvária foram descalcificadas em EDTA a 4%, lavadas em água corrente e desidratadas por meio de uma sequência de álcoois com concentração crescente (50% a 100%). Em seguida, foi realizada a diafanização das peças em xilol até ficarem transparentes e a impregnação em parafina, em estufa a 60°C, em três banhos de 3 horas. Na etapa seguinte, foi realizada a inclusão das peças em formas com parafina e o corte em micrótomo com espaçamento padronizado de 5 μm de espessura, seguido de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram obtidas em microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss), captadas por câmera digital (AxioCam ICc3, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio e processadas com o software Axion Vision (AxioCam ICc3, Carl Zeiss).

3.3. Análise Estatística

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

Para todos os experimentos que envolveram comparações múltiplas foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, quando aplicado. Para aqueles que envolveram comparações entre dois grupos, o test t. Para todas as comparações foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Proliferação Celular de OB-Cal, OB-CN e OB-MS

A proliferação celular aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$) de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi estatisticamente significativa entre as culturas ($p=0,001$) com $OB-Cal = OB-CN < OB-MS$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias não houveram diferenças estatisticamente significantes entre as culturas, porém, aos 7 e 10 dias a proliferação de OB-MS foi maior do que a de OB-Cal e OB-CN, que não foram diferentes entre si. Os dados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Proliferação de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS) crescidos sobre poliestireno aos 3, 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.2. Medida da Atividade de ALP de OB-Cal, OB-CN e OB-MS

A atividade de ALP aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$) com maior atividade detectada aos 10 dias do que aos 7 dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$) sendo que $OB-Cal = OB-CN < OB-MS$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 7 dias não houveram diferenças estatisticamente significantes na atividade de ALP entre as culturas, porém,

aos 10 dias essa atividade foi maior em OB-MS quando comparados com OB-Cal e OB-CN, que não foram diferentes entre si. Os dados estão apresentados na Figura 2.

Figura 2. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), crescidos sobre poliestireno aos 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.3. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada de OB-Cal, OB-CN e OB-MS

Aos 14 dias de cultivo celular, foi observado que OB-Cal, OB-CN e OB-MS produziram mineralização da matriz extracelular, visualizada através da coloração com vermelho de Alizarina, o qual foi posteriormente quantificado. Contudo, não houveram diferenças estatisticamente significantes na quantificação dessa coloração entre as culturas. Os dados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Matriz extracelular mineralizada produzida por osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS) crescidos sobre poliestireno por 14 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5).

4.4. Avaliação da Integridade do RNA Total de OB-Cal, OB-CN e OB-MS

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 de OB-Cal, OB-CN e OB-MS se encontravam íntegros (Figura 4).

Figura 4. Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), aos 3, 7 e 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.

4.5. Expressão dos Genes Marcadores Osteoblásticos de OB-Cal, OB-CN e OB-MS

A expressão relativa do gene RUNX2 aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal > OB-MS > OB-CN$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que, aos 3 dias a expressão relativa de RUNX2 foi maior em OB-Cal quando comparados a OB-CN e OB-MS, que não foram diferentes entre si, porém, aos 7 e 10 dias a expressão relativa de RUNX2 foi maior em OB-Cal comparados a OB-CN que foi menor que OB-MS (Figura 5 A).

A expressão relativa do gene ALP aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal > OB-MS > OB-CN$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias, a expressão relativa de ALP foi menor em OB-Cal, quando comparados a OB-CN e OB-MS, que não foram diferentes entre si, porém, aos 7 e 10 dias, a expressão relativa de ALP foi maior em OB-Cal, comparados a OB-MS que foi maior que OB-CN (Figura 5 B).

A expressão relativa do gene OC aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal > OB-MS > OB-CN$. A interação entre o tempo e as

culturas mostrou que, aos 3 dias a expressão relativa de OC foi menor em OB-Cal quando comparados a OB-CN e OB-MS, que não foram diferentes entre si, porém, aos 7 e 10 dias, a expressão relativa de OC foi maior em OB-Cal, comparados a OB-MS que foi maior que OB-CN (Figura 5 C).

A expressão relativa do gene BSP foi diferente ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3>7<10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal>OB-MS>OB-CN$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias, a expressão relativa de BSP foi menor em OB-Cal, quando comparados a OB-MS, que foi menor que OB-CN, porém, aos 7 dias, a expressão relativa de BSP foi maior em OB-MS, comparados a OB-Cal, que foi maior que OB-CN; e aos 10 dias, a expressão relativa de BSP foi maior em OB-Cal, comparados a OB-MS, que foi maior que OB-CN (Figura 5 D).

Figura 5. Expressão relativa dos genes marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), ALP (B), OC (C) e BSP (D) de osteoblastos de ratos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e calibrados em relação à expressão dos genes de OB-Cal aos 3 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

4.6. Proliferação Celular de OB-Cal e OB-Cal P1

A proliferação celular aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal < OB-Cal P1$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3, 7 e 10 dias a proliferação de OB-Cal P1 foi maior do que a proliferação de OB-Cal. Os dados estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Proliferação de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.7. Medida da Atividade de ALP de OB-Cal e OB-Cal P1

A atividade de ALP aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), com maior atividade detectada aos 10 do que aos 7 dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que $OB-Cal < OB-Cal P1$. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 7 dias de cultura, a atividade de ALP foi maior em OB-Cal P1 que em OB-Cal, porém, aos 10 dias não houveram diferenças estatisticamente significantes entre as culturas. Os dados estão apresentados na Figura 7.

Figura 7. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 7 e 10 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.8. Detecção e Quantificação da Formação de Matriz Extracelular Mineralizada de OB-Cal e OB-Cal P1

Aos 14 dias de cultivo celular, foi observado que OB-Cal e OB-Cal P1 produziram mineralização da matriz extracelular, visualizada através da coloração com vermelho de Alizarina, o qual foi posteriormente quantificado e mostrou que OB-Cal produziu maior mineralização da matriz extracelular que OB-Cal P1. Os dados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. Matriz extracelular mineralizada produzida por osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 14 dias, e sua quantificação. Asterisco (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste T, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.9. Avaliação da Integridade do RNA Total de OB-Cal e OB-Cal P1

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 de OB-Cal P1 se encontravam íntegros (Figura 9).

Figura 9. Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1), aos 3, 7 e 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.

4.10. Expressão de Genes Marcadores Osteoblásticos de OB-Cal e OB-Cal P1

A expressão relativa do gene RUNX2 foi diferente ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 > 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que OB-Cal > OB-Cal P1. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias, a expressão relativa de RUNX2 foi maior em OB-Cal P1, porém, aos 7 e 10 dias foi maior em OB-Cal (Figura 10 A).

A expressão relativa do gene ALP aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que OB-Cal > OB-Cal P1. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias, não houveram diferenças estatisticamente significantes na expressão relativa de ALP entre as culturas, porém, aos 7 dias foi maior em OB-Cal P1 e aos 10 dias foi maior em OB-Cal (Figura 10 B).

A expressão relativa do gene OC aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que OB-Cal > OB-Cal P1. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3 dias, não houveram diferenças estatisticamente significantes na expressão relativa de OC entre as culturas, porém, aos 7 dias foi maior em OB-Cal P1 e aos 10 dias foi maior em OB-Cal (Figura 10 C).

A expressão relativa do gene BSP aumentou ao longo do tempo de cultura ($p=0,001$), de tal forma que $3 < 7 < 10$ dias e foi diferente entre as culturas ($p=0,001$), sendo que OB-Cal > OB-Cal P1. A interação entre o tempo e as culturas mostrou que aos 3, 7 e 10 dias, a expressão relativa de BSP foi maior em OB-Cal (Figura 10 D).

Os resultados da expressão relativa dos genes citados estão apresentados na Figura 10.

Figura 10. Expressão relativa dos genes marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), ALP (B), OC (C) e BSP (D) de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após cultura primária (OB-Cal) e uma passagem (OB-Cal P1), crescidos sobre poliestireno, aos 3, 7 e 10 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPDH e calibrados em relação à expressão dos genes de OB-Cal aos 3 dias. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

4.11. Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classe I e II) em OB-Cal P1

Aos 7 dias de cultura, OB-Cal P1 apresentaram ausência relativa de células expressando MHC classe I e II, conforme demonstrado nos histogramas (Figura 11 A-C) e na porcentagem de células marcadas com os anticorpos (Figura 11 D). A utilização dos controles negativo e positivo demonstrou o correto funcionamento dos anticorpos empregados, conforme constatado nos histogramas (Figura 11 E-G) e na porcentagem de partículas κ marcadas com os anticorpos (Figura 11 H).

Figura 11. Imunofenotipagem de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) cultivados por 7 dias. Os histogramas mostram células que não foram incubadas com o anticorpo (A), utilizadas como controle para as marcações, assim como ausência relativa de expressão de MHC Classe I e II (B e C). Os números indicam a porcentagem de OB-Cal P1 marcados com os anticorpos (D). Adicionalmente observa-se o controle negativo e os controles positivos para os anticorpos MHC classe I e II (E, F e G). Os números indicam a porcentagem de partículas κ marcadas com os anticorpos (H).

4.12. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos

4.12.1. Análise Microtomográfica

As reconstruções microtomográficas tridimensionais evidenciaram, após 4 semanas da injeção, a presença de tecido ósseo formado nas margens e no interior dos defeitos injetados com OB-Cal P1 (Figura 12 A) e veículo sem células (Controle) (Figura 12 B). Contudo, nota-se que houve maior formação de tecido ósseo nos animais tratados com OB-Cal P1 em comparação com o controle (Figura 12 A e B).

Figura 12. Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A e B) de defeitos ósseos criados em calvária de ratos, tratados com injeção de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) (A) ou veículo sem células (Controle) (B), ao final de 4 semanas.

4.12.2. Análise Morfométrica

As análises morfométricas de tecido ósseo formado em defeitos ósseos tratados com OB-Cal P1 e veículo sem células, indicaram diferenças estatisticamente significantes nos seguintes parâmetros avaliados: volume ósseo, volume ósseo/volume total, superfície óssea, espessura trabecular, número trabecular e separação trabecular. O volume de tecido ósseo foi maior em defeitos ósseos tratados com OB-Cal P1 (Figura 13 A), assim como o volume ósseo/volume total (Figura 13 B), superfície óssea (Figura 13 C) e número trabecular (Figura 13 E). Os parâmetros espessura trabecular e separação trabecular foram menores nos defeitos ósseos tratados com OB-Cal P1 (Figura 13 D e F). Os dados estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Parâmetros morfométricos obtidos após a reconstrução microtomográfica de tecido ósseo formado em defeitos ósseos criados nas calvárias de ratos, tratados com injeção de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) ou de veículo sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa (Teste T, $p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=12$).

4.12.3. Análise Histológica

A análise histológica mostrou ausência de sinais inflamatórios em ambos os grupos e maior formação óssea nos defeitos tratados com OB-Cal P1 (Figura 14 A) comparado ao veículo sem células (Controle) (Figura 14 B). A formação óssea e de tecido conjuntivo foram observados em ambos os grupos. A formação óssea nos defeitos injetados com OB-Cal P1 (Figura 14 C) mostrou um tecido mais espesso na margem do defeito tornando-se mais delgado no centro. Nos defeitos controle (Figura 14 D) a formação óssea ficou restrita às margens do defeito. Em ambos os defeitos, injetados com OB-Cal P1 e veículo

sem células, observou-se tecido ósseo maduro com lamelas organizadas e paralelas entre si (Figura 14 C e D), tecido ósseo imaturo (Figura 14 E e F) e osteoblastos revestindo a superfície óssea (Figura 14 E e F; insertos).

Figura 14. Fotomicrografias de defeitos ósseos criados em calvária de ratos, após injeção de de osteoblastos obtidos da calvária de ratos após uma passagem (OB-Cal P1) (A, C e E) ou de veículo sem células (Controle) (B, D e F), ao fim de 4 semanas. Defeitos injetados com OB-Cal P1 (A) exibiram maior formação óssea em comparação com o Controle (B). A área de formação óssea nos defeitos injetados com OB-Cal P1 (C) se estendeu em direção ao centro do defeito, enquanto que no Controle (D), uma pequena área de formação óssea se restringiu às margens do defeito. Em ambos os defeitos injetados com OB-Cal P1 e Controle, observa-se tecido ósseo maduro com lamelas organizadas e paralelas entre si (C e D), tecido ósseo imaturo (E e F), além de osteoblastos organizados em camada na superfície óssea (E e F; insertos). Os detalhes histológicos descritos estavam presentes em todos os defeitos ósseos, independentemente do tipo de tratamento (OB-Cal P1 ou Controle). Hematoxilina e Eosina. tol: tecido ósseo lamelar; toi: tecido ósseo imaturo; tc: tecido conjuntivo. Barra de escala: A e B = 800 µm; C e D = 200 µm; E e F: 100 µm; insertos: 50 µm.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a terapia celular com osteoblastos na regeneração do tecido ósseo. Primeiramente, foi avaliado in vitro o potencial osteogênico de osteoblastos obtidos do osso frontal, que são originados da crista neural; obtidos do osso parietal, que são derivados do mesoderma; e de toda a calvária, que possui a combinação de ambas as origens embrionárias. Os resultados mostraram que a origem embrionária altera o potencial osteogênico sem, contudo, alterar o evento final da diferenciação osteoblástica que é a formação de matriz extracelular mineralizada. Avaliamos o efeito da subcultura sobre o potencial osteogênico, que mostrou que na primeira passagem há diminuição na expressão de marcadores da diferenciação osteoblástica, mas as células ainda conservam potencial osteogênico. Defeitos ósseos injetados com osteoblastos apresentaram maior formação óssea do que os controles, mas ainda sem ocorrer a completa regeneração desses defeitos.

As culturas de OB-Cal, OB-CN e OB-MS apresentaram aumento no número de células ao longo dos períodos avaliados indicando que todas as culturas apresentaram proliferação, porém as culturas de OB-MS apresentaram maior proliferação que as demais aos 7 e 10 dias. Esses achados corroboram estudo anterior em que células osteoblásticas de origem mesodérmica, obtidas da tíbia de ovinos, apresentaram maior proliferação que as da crista neural, obtidas de mandíbula (Reichert et al., 2013). Por outro lado, estão em desacordo com aqueles reportados por Li et al. (2010) que mostraram que, em camundongos, para osteoblastos derivados da calvária, aqueles da crista neural apresentam maior potencial proliferativo do que os de origem mesodérmica. Mesmo considerando que os diferentes métodos utilizados nesses estudos para avaliar a proliferação celular possam ter influenciado os resultados obtidos, essas diferenças são sugestivas da existência de mecanismos espécie específicos que mereceriam investigações posteriores.

A atividade de ALP e a formação de matriz mineralizada foram avaliadas nas culturas devido às suas importâncias como marcador intermediário, no caso da primeira, e final, no caso da segunda. Comprovando que as culturas eram osteoblásticas, todas apresentaram atividade de ALP e formaram matriz

mineralizada. No entanto, enquanto a atividade de ALP foi maior nas culturas OB-MS, não houve diferença entre elas na formação de matriz mineralizada. Embora seja reconhecido que a atividade de ALP é fundamental para que ocorra a formação de matriz mineralizada (Sugawara et al., 2002; Beck et al., 2003), não há correlação positiva entre essa atividade enzimática e a quantidade de matriz mineralizada formada. Aparentemente, existe um mínimo de atividade de ALP que é capaz de induzir a formação de matriz mineralizada (Beloti & Rosa, 2005).

Com relação à expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica RUNX2, ALP, OC e BSP; de maneira geral e independentemente do período de avaliação, observou-se maior expressão de todos eles em culturas de OB-Cal, que foi maior do que OB-MS, que por sua vez foi maior do que OB-CN. O RUNX2 é um fator de transcrição de fundamental importância na diferenciação osteoblástica, a ALP na formação de matriz mineralizada, enquanto que OC e BSP são proteínas não colágenas da matriz extracelular, as quais estão envolvidas, respectivamente, na enucleação dos cristais de hidroxiapatita e modulação da mineralização da matriz extracelular (Owen et al., 1990; Gams et al., 1999; Komori et al., 2010).

Conquanto esses resultados comprovem o potencial osteogênico de todas as culturas, o conjunto de dados aponta que as OB-CN apresentaram o menor potencial. Assim como a proliferação celular, esses dados estão em desacordo com aqueles reportados para culturas derivadas de camundongos, para as quais o maior potencial osteogênico é de osteoblastos derivados da crista neural (Li et al., 2010; Li et al., 2013; Quarto et al., 2010). No entanto, a questão da origem embrionária é complexa porque até mesmo osteoblastos que compartilham a mesma origem embrionária, porém obtidos de sítios ósseos diferentes, podem ter potencial osteogênico e capacidade de diferenciação distintos (Ferraz et al., 2014). Nesse caso, diferenças espécie específicas não explicariam essa aparente contradição, porque nossos experimentos para avaliar a expressão gênica em culturas de osteoblastos de camundongos mostraram perfil de expressão similar aos de culturas derivadas de ratos (Anexo A). É possível que diferenças na composição e origem dos reagentes e métodos experimentais na obtenção, cultura e avaliação das repostas celulares tenham contribuído para as diferenças encontradas.

Considerando que não houve diferença entre as culturas no evento final da diferenciação osteoblástica, que é a formação de matriz mineralizada; que as culturas derivadas de toda a calvária apresentaram maior expressão gênica de marcadores iniciais, intermediários e finais dessa diferenciação; e que essas culturas são aquelas nas quais é possível obter o maior número de células; optamos por utilizar essas culturas na avaliação da formação óssea induzida pela terapia celular.

A despeito de se obter maior quantidade de células com digestões enzimáticas sequenciais de toda a calvária, a quantidade de células obtidas para cultura primária dessa maneira é relativamente pequena, onde se obtém aproximadamente 3×10^5 células por calvária (Bellows, Aubin, 1989). Como nosso grupo padronizou utilizar 5×10^6 células para uma única injeção local em defeitos ósseos de 5 mm criados na calvária de ratos (Freitas et al., 2017), a utilização de células da cultura primária acarretaria no uso de grande número de animais para se obter a quantidade de células necessárias para as injeções. Isso é contrário aos movimentos para redução no uso de animais (Flecknell, 2002; Understanding Animal Research, 2017). Dessa forma, decidimos realizar o subcultivo de OB-Cal para permitir o crescimento e expansão das mesmas e obtermos células da primeira passagem (OB-Cal P1) em quantidade suficiente para aplicação em terapia celular.

A comparação entre as culturas de OB-Cal e OB-Cal P1 mostrou que as últimas apresentaram maior capacidade proliferativa mas que a subcultura resultou em redução no potencial osteogênico, revelado por menor atividade de ALP, menor formação de matriz mineralizada e redução na expressão de genes marcadores osteoblásticos. Vários estudos mostram a relação do efeito do número de passagens com mudanças nos perfis de expressão gênica e metabolismo das células. Via de regra, quanto maior o número de passagens, maiores as alterações morfológicas e fisiológicas nas células (Briske-Anderson et al., 1997; O'Driscoll et al., 2006; Liu et al., 2014; Corrêa et al., 2016). Como resultados preliminares do nosso grupo mostraram que não parece haver relação entre o potencial osteogênico in vitro e a capacidade de induzir formação óssea, as células OB-Cal P1 pareceram adequadas para essa investigação.

Um dos desafios para a utilização de células alógenas, tanto em terapia

celular quanto em engenharia de tecidos, consiste na possibilidade de rejeição dessas células pelo sistema imunológico do hospedeiro. Para tanto, moléculas de MHC Classes I e II são encarregadas de apresentar peptídeos antigênicos para células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente (Doherty et al., 1994; Doherty et al., 1997; Mokhtari, Lachman, 2016). Os resultados de citometria de fluxo mostraram ausência relativa dessas moléculas em OB-Cal P1, permitindo que fossem utilizadas com riscos mínimos de resposta imune nos ratos em que foram injetadas. Isso corrobora estudos anteriores que relataram baixos níveis de MHC Classe I e ausência de MHC Classe II em cultura de células-tronco embrionárias, além de ausência ou expressão baixa de MHC Classe II em cultura de osteoblastos (Skjodt et al, 1989; Khoury, Arnaud, 1993; Heinemann et al., 2000; Reyes-Botella et al., 2002, Schrum et al., 2003). Sugere-se que isso ocorra pelas condições de cultura *in vitro*, ou pela presença de outras células estromais, como as células endoteliais nessas culturas (Khoury, Arnaud, 1993).

A estratégia de terapia celular utilizando injeções diretas de OB-Cal P1 nos defeitos de calvária de ratos resultou na maior formação de tecido ósseo comparado aos defeitos tratados apenas com veículo (Controle), como evidenciado pelas reconstruções 3D. Dos seis parâmetros morfométricos utilizados, em cinco deles (volume ósseo, volume ósseo/volume total, superfície óssea, número trabecular e separação trabecular), observou-se que a utilização de OB-Cal P1 aumentou a formação óssea. Para apenas o parâmetro espessura trabecular, a utilização de osteoblastos aparentou menor formação óssea. No entanto, mesmo para os defeitos tratados com células não observamos a completa regeneração dos defeitos ósseos.

A análise histológica evidenciou diferenças importantes nos tecidos que preenchiam os defeitos, sendo encontrado em todos eles a presença de tecido conjuntivo e áreas de tecido ósseo neoformado, as quais, confirmando os dados tomográficos, foram maiores nos defeitos tratados com OB-Cal P1. A presença de tecido ósseo maduro com lamelas organizadas e paralelas entre si, tecido ósseo imaturo e osteoblastos organizados em camada na superfície óssea, sugerem atividade osteoblástica com formação óssea em estágios diferentes de desenvolvimento.

Os resultados microtomográficos e histológicos corroboram estudos do nosso grupo de pesquisa em que empregamos estratégias de terapia celular ou engenharia de tecidos na tentativa de regenerar defeitos ósseos em calvária de ratos. A utilização de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea ou de tecido adiposo, ambas indiferenciadas ou induzidas à diferenciação osteoblástica, resultou em formação de tecido ósseo, assim como a utilização das mesmas combinadas com biomateriais (arcabouços e membranas) (Freitas et al., 2016; Minari et al., 2016; Almeida, 2017; Ferraz et al., 2017; Freitas et al., 2017).

Os resultados aqui apresentados, revelam que a terapia celular com injeção local de osteoblastos obtidos de fragmentos ósseos da calvária constitui uma estratégia adequada para estimular o reparo ósseo. No entanto, a despeito da formação óssea, esse tratamento não foi capaz de regenerar completamente os defeitos ósseos. Portanto, dando continuidade à essa estratégia, nosso grupo de pesquisa deverá realizar novas investigações utilizando diferentes combinações de células com fatores de crescimento.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A combinação de osteoblastos de ambas origens embrionárias (crista neural e mesoderma) possuem maior potencial osteogênico do que osteoblastos de origens embrionárias isoladas.

Osteoblastos de calvária de ratos têm seu potencial osteogênico reduzido após subcultura.

A utilização de osteoblastos constitui um método adequado para utilização em estratégias de terapia celular, onde a injeção local dessas células em defeitos ósseos resulta em maior formação óssea, sem reparo completo dos mesmos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, AL. Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no reparo ósseo em ratas osteoporóticas. Mestrado. Ribeirão Preto, 2017.

American Society of Gene and Cell Therapy. Cell therapy and cell therapy defined. Disponível em: <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined>.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue engineering: recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012;40:363-408.

Bakela K, Athanassakis I. Soluble MHC molecules in immune regulation: Highlighting class II antigens. Immunol. 2017;doi: 10.1111/imm.12868.

Beck GR Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. J Cell Biochem. 2003;90:234-24.

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. Braz Dent J. 2005;16:156-161.

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.

Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. Dev Biol. 1989;133:8–13.

Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1997;214:248-257.

Brydone AS, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224:1329-1343.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127:1671–1679.

Chai Y, Maxson RE Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006;235:2353-2375.

Chavda S, Levin L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: A systematic review. *J Oral Implantol*. 2017; doi: 10.1563/aaid-joi-D-17-00053.

Corrêa AL, Senna JP, de Sousa ÁP. Effects of passage number on growth and productivity of hybridoma secreting MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies. *Cytotechnology*. 2016;68:419-427.

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials*. 2004;25:403-413.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:633-641.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80:554-564.

Doherty PC, Hou S, Tripp RA. CD8 T-cell memory to viruses. *Curr Opin Immunol*. 1994;6:545-552.

Doherty PC, Topham DJ, Tripp RA, Cardin RD, Brooks JW, Stevenson PG. Effector CD4 and CD8 T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol Rev.* 1997;159:105-117.

Erac Y, Selli C, Filik P, Tosun M. Effects of passage number on proliferation and store-operated calcium entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2014;70:1-5.

Ferraz EP, Freitas GP, Crovace MC, Peitl O, Zanotto ED, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (BioS-2P) for bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2017;12. doi: 10.1088/1748-605X/aa768e.

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–e35.

Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 2002;19:73-78.

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

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Bone formation in calvarial defects treated with mesenchymal stem cells or osteoblasts derived from adipose tissue: microtomographic analysis. *Mol Biol Cell.* 2016;15:515-515.

Gams B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10:79-98.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329:77-84.

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.

Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kübler NR, Meyer U. Cell-based bone reconstruction therapies—cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:890-898.

Heinemann DE, Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, Koster G. Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82:283-289.

Iseki S, Wilkie AO, Heath JK, Ishimaru T, Eto K, Morriss-Kay GM. Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2. *Development.* 1997;124:3375-3384.

Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM. Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol.* 2002;24:106–116.

Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand.* 1999;70:365–373.

Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19:513-521.

Kappe T, Cakir B, Mattes T, Reichel H, Flören M. Infections after bone allograft surgery: a prospective study by a hospital bone bank using frozen femoral heads from living donors. *Cell Tissue Bank.* 2010;11:253–259.

Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:77–86.

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

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

LaBonne C, Bronner-Fraser M. Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:81-112.

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

Li S, Meyer NP, Quarto N, Longaker MT. Integration of multiple signaling regulates through apoptosis the differential osteogenic potential of neural crest-derived and mesoderm-derived osteoblasts. *PLoS One*. 2013;8(3):e58610. doi: 10.1371/journal.pone.0058610.

Li S, Quarto N, Longaker MT. Activation of FGF signaling mediates proliferative and osteogenic differences between neural crest derived frontal and mesoderm parietal derived bone. *PLoS One*. 2010 5(11):e14033

Li S, Quarto N, Senarath-Yapa K, Grey N, Bai X, Longaker MT. Enhanced activation of canonical Wnt signaling confers mesoderm-derived parietal bone with similar osteogenic and skeletal healing capacity to neural crest-derived frontal bone. *PLoS One*. 2015;10.doi:10.1371/journal.pone.0138059.

Liu P, Kaplan A, Yuan B, Hanna JH, Lupski JR, Reiner O. Passage number is a major contributor to genomic structural variations in mouse iPSCs. *Stem Cells*. 2014;32:2657-2667.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods*. 2001;25:402-408.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.

Ma B, Leijten JC, Wu L, Kip M, Van Blitterswijk CA, Post JN, Karperien M. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:599-603.

Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19:455-466.

Minari VA, Freitas GP, Lopes HB, Almeida AL, Souza, LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Efeito de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea injetadas localmente no reparo do tecido ósseo. *Braz Oral Res.* 2016;30:114-114.

Mokhtari R, Lachman HM. The Major Histocompatibility complex (MHC) in schizophrenia: a review. *J Clin Cell Immunol.* 2016; doi: 10.4172/2155-9899.1000479.

Morimoto E, Li M, Khalid AB, Krum SA, Chinge NO, Frenkel B. Glucocorticoids and hijack runx2 to stimulate Wif1 for supression of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Physiol.* 2017;232:145-153.

Morriss-Kay GM. Derivation of the mammalian skull vault. *J Anat.* 2001;199:143-151.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.

O'Driscoll L, Gammell P, McKiernan E, Ryan E, Jeppesen PB, Rani S, Clynes M. Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *J Endocrinol.* 2006; 191:665-676.

Owen T, Aronow M, Shalhoub V, Barone L, Wilming LM, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990;143:420-430.

Peck WA; Birge SJ; Fedak SA. Bone cells: Biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science.* 1964;146:1476-1477.

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.

Quarto N, Wan DC, Kwan MD, Panetta NJ, Li S, Longaker MT. Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *J Bone Miner Res.* 2010;25:1680-1694.

Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VM, Hutmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular difference. *Gene.* 2013;525:99-106.

Reyes-Botella C, Montes MJ, Vallecillo-Capilla MF, Olivares EG, Ruiz C. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell Physiol Biochem.* 2002;12:359-364.

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

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 $\alpha 1\beta 1$ integrin signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2014;115:540-548.

Santos T, Flores Abuna RP, Bacha Lopes H, Gonçalves de Almeida AL, Beloti MM, Luiz Rosa A. Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. *Regen Med.* 2015;10:127-133.

Schrum LW, Bost KL, Hudson MC, Marriott I. Bacterial infection induces expression of functional MHC class II molecules in murine and human osteoblasts. *Bone.* 2003;33:812–882.

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.

Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hüfner M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;75: 22–35.

Skjodt H, Moller T, Freiesleben SF. Human osteoblast-like cells expressing MHC class II determinants stimulate allogeneic and autologous peripheral blood mononuclear cells and function as antigenpresenting cells. *Immunol.* 1989;68:416–420.

Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Lida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002;88:262-269.

Understanding Animal Research. Disponível em:
<http://www.understandinganimalresearch.org.uk/how/three-rs/>

Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep*. 2004;24:631-639.

Yoshida T, Vivatbutsiri P, Morriss-Kay G, Saga Y, Iseki S. Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev*. 2008;125:797–808.

Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-195.

Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharmaceutical Research*. *Pharm Res*. 1997;14:757-762.

Zhao S, Chen C, Wang S, Ji F, Xie Y. MHY1485 activates mTOR and protects osteoblasts from dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;481:212-218.

Zheng GS, Su YX, Liao GQ, Chen ZF, Wang L, Jiao PF, Liu HC, Zhong YQ, Zhang TH, Liang YJ. Mandible reconstruction assisted by preoperative virtual surgical simulation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113:604-611.

Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122:392-402.

Zwingenberger S, Nich C, Valladares RD, Yao Z, Stiehler M, Goodman SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *BioDrugs*. 2012;26:245-256.

ANEXO A

Os osteoblastos foram obtidos de fragmentos do osso frontal (OB-CN), parietal (OB-MS) e de toda a calvária (OB-Cal) de camundongos recém-nascidos (C5BL6), por meio de digestão enzimática sequencial e aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a expressão gênica de RUNX2, ALP, OC e BSP foi avaliada em todas nessas células por PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente.

A expressão relativa de RUNX2 foi maior em OB-Cal quando comparados à OB-CN ($p=0,001$), mas não à OB-MS, que não foram diferentes entre si. A expressão relativa de ALP e OC foi maior em OB-Cal, comparados à OB-MS, que foi maior que OB-CN ($p=0,001$). A expressão relativa de BSP foi maior em OB-Cal, comparados à OB-CN, que foi maior que OB-MS ($p=0,001$).

ANEXO A. Expressão relativa de genes marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), ALP (B), OC (C) e BSP (D) de osteoblastos de camundongos derivados da crista neural e mesoderma (calvária: OB-Cal), da crista neural (osso frontal: OB-CN) e do mesoderma (osso parietal: OB-MS), crescidos sobre poliestireno, aos 7 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e calibrados em relação à expressão dos genes de OB-Cal. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p \leq 0,05$, para RUNX2 e Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$, para ALP, OC e BSP). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação do potencial de células osteoblásticas de diferentes origens embrionárias na regeneração do tecido ósseo”, registrada com o nº 2016.668.58.0 sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 21/09/2016.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	01/10/2016 a 31/12/2017	
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico / Wistar	
Nº de animais	60	250
Peso/Idade	200 g / 4 semanas	200 g / 3 dias
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central – PUSP-RP	

Ribeirão Preto, 21 de setembro de 2016.

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

CEUA - FORP/USP

ANEXO C

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 150/2017

Ribeirão Preto, 20 de setembro de 2017.

Ref. processo nº 2016.1.668.58.0

Senhor Pesquisador,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 51ª Sessão, realizada em 20/09/2017, **aprovou** o acréscimo de animais do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação do potencial de células osteoblásticas de diferentes origens embrionárias na regeneração do tecido ósseo", **conforme solicitado: 35 camundongos da linhagem C57BL-5, machos, recém-nascidos.**

Salientamos que, caso sejam realizadas alterações no protocolo experimental, deverá ser submetido novo projeto para apreciação desta CEUA.

Lembramos que o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até o dia 31/01/2018.**

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia
desta Faculdade

./aafn

3315-98 07/09/2017 11:42