UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Rodrigo Paolo Flores Abuna

**ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO E ADIPOGÊNICO DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA
E DE TECIDO ADIPOSEO**

Ribeirão Preto

2014

RODRIGO PAOLO FLORES ABUNA

**ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO E ADIPOGÊNICO DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA
E DE TECIDO ADIPOSEO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Oral.

Programa: Reabilitação Oral

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2014

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Abuna, Rodrigo Paolo Flores

Análise do potencial osteogênico e adipogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e de tecido adiposo. Ribeirão Preto, 2014.

50 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus.

1. Osteoblastos. 2. Adipócitos. 3. Medula óssea. 4. Tecido Adiposo. 5. Células-tronco mesenquimais. 6. Diferenciação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rodrigo Paolo Flores Abuna

Título: Análise do potencial osteogênico e adipogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e de tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Oral.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia
Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo com auxílio financeiro FAPESP (Processo no. 2011/10658-8)**

Dedico este trabajo a mi maravillosa mamá, Julieta Abuná y a mi abuelita “Vicky” que desde el cielo aún me guía. Ambas supieron darme apoyo, amor incondicional, lucharon muchísimo y por ellas hoy estoy aquí. Muchísimas gracias. ¡Las amo mucho!

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil, país maravilhoso que me acolheu com alegria, calor e muito amor.

À Universidade de São Paulo, representada pelo reitor Prof. Dr. Marco Antonio Zago. Espero algum dia poder retribuir um pouco de tudo o que já recebi.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Valdemar Mallet de Rocha Barros.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pela orientação, confiança, paciência, amizade e grande oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal que principalmente com seu exemplo me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por todo auxílio ao projeto, pela oportunidade de conviver um pouco e aprender com suas experiências. Foi uma honra tê-lo conhecido.

Ao Prof. Paulo Tambasco de Oliveira, muito obrigado pelo constante apoio.

À Fabiola Singaretti de Oliveira, pela amizade, carinho, tempo e apoio desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório. Te adoro Fá!

Ao Roger Rodrigo Fernandez, pelo apoio constante, amizade e tempo compartilhado.

A Milla Sprone Tavares Ricoldi, pela amizade, complexas conversas, pelo apoio nos experimentos, por sua sinceridade e sobretudo pela alegria que sempre trouxe ao laboratório.

Ao Dr. Thiago de Santana Santos, pelo apoio constante e grande amizade construída nestes dois anos.

Aos grandes amigos Emanuela Ferraz, Natalia Manrique, Larissa Castro, Lucas Novaes, Gabriela Cerminaro, Larissa Bellesini, Gileade Pereira, Helena Bacha, Fernanda Grilo, Mayara Sgarbi, Renan Bueno, Rogério Kato, Patricia Adachi, Thais Guerra, Gabriela Alonso, Marcelo Francischini e Leonardo Fiori pelos bons momentos compartilhados e cujo apoio foi muito importante dentro e fora do laboratório.

Ao Christopher Carvalho, o amigo que sempre apareceu nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, por fim, gostaria de agradecer a Deus. Por fazer com que neste tempo, sinta sua presença constante e amor infinito.

RESUMO

Abuna RPF. **Análise do potencial osteogênico e adipogênico de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e de tecido adiposo** [Dissertação]. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. 2014

Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTMs-MO) e de tecido adiposo (CTMs-TA) são uma ferramenta atrativa para a reparação do tecido ósseo baseada na terapia celular. No presente estudo, foi investigado o potencial osteogênico e adipogênico de CTMs-MO e CTMs-TA, assim como o efeito da intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos na expressão do fenótipo celular. CTMs-MO e CTMs-TA de ratos foram cultivadas em meios de crescimento, osteogênico e adipogênico para avaliar a diferenciação osteoblástica e adipocítica. Adicionalmente, osteoblastos e adipócitos foram cocultivados de forma indireta para investigar o efeito dos adipócitos sobre os osteoblastos e vice versa. CTMs-MO e CTMs-TA apresentaram potencial tanto osteogênico quanto adipogênico em condições não indutoras de diferenciação. No entanto, quando expostas ao meio osteogênico, as CTMs-MO exibiram maior expressão gênica de RUNX2, fosfatase alcalina e osteocalcina, expressão proteica de RUNX2 e maior formação de matriz extracelular mineralizada comparadas às CTMs-TA. Por outro lado, em condições adipogênicas, as CTMs-TA apresentaram maior expressão gênica de PPAR γ , proteína adipocítica 2 e resistina, expressão proteica de PPAR γ e maior formação de acúmulo lipídico comparadas às CTMs-MO. A presença de adipócitos em coculturas indiretas inibiu a expressão do fenótipo osteoblástico, enquanto os osteoblastos não apresentaram um efeito marcante sobre a expressão do fenótipo adipocítico. Em conclusão, o presente estudo mostrou que as CTMs-MO são mais osteogênicas enquanto as CTMs-TA são mais adipogênicas. Adicionalmente, foi observado que a intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos pode afetar negativamente o reparo ósseo. Assim, postulamos que o maior potencial osteogênico das CTMs-MO as tornam a escolha mais adequada para a indução do reparo ósseo baseado na terapia celular.

Palavras chave: Osteoblastos, Adipócitos, Medula óssea, Tecido adiposo, Células-tronco mesenquimais, Diferenciação.

ABSTRACT

Abuna RPF. **Analysis of osteogenic and adipogenic potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue.** [Masters Degree]. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. 2014.

Mesenchymal stem cells from bone marrow (BM-MSCs) and adipose tissue (AT-MSCs) are attractive tools for cell-based therapies to repair bone tissue. In the present study, we investigated the osteogenic and adipogenic potential of BM-MSCs and AT-MSCs as well as the effect of crosstalk between osteoblasts and adipocytes on cell phenotype expression. Rat BM-MSCs and AT-MSCs were cultured either in growth, osteogenic or adipogenic medium to evaluate osteoblast and adipocyte differentiation. Also, osteoblasts and adipocytes were indirectly cocultured to investigate the effect of adipocytes on osteoblast differentiation and vice versa. BM-MSCs and AT-MSCs exhibit osteogenic and adipogenic potential under non-differentiation-inducing conditions. However, when exposed to osteogenic medium, BM-MSCs exhibited higher gene expression of RUNX2, alkaline phosphatase and osteocalcin, RUNX2 protein expression and more extracellular matrix mineralization compared with AT-MSCs. Conversely, under adipogenic conditions, AT-MSCs displayed higher gene expression of PPAR γ , fatty acid binding protein 4 and resistin, PPAR γ protein expression and more lipid accumulation compared with BM-MSCs. The presence of adipocytes as indirect coculture repressed the expression of osteoblast phenotype while osteoblasts did not exert remarkable effect on adipocyte phenotype expression. In conclusion, the present study showed that BM-MSCs are more osteogenic while AT-MSCs are more adipogenic. Also, we observed that the crosstalk between osteoblasts and adipocytes may negatively impact bone repair. Thus, we postulate that the higher osteogenic potential of BM-MSCs makes them the first choice for inducing bone repair in cell-based therapies.

Key-words: Osteoblast, Adipocyte, Bone marrow, Adipose tissue, Mesenchymal stem cells, Differentiation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS.....	17
3.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO	17
3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA	17
3.1.3 Cultura e diferenciação de CTMs-MO e CTMs-TA	18
3.1.4 Cocultura	19
3.2 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES	19
3.2.1 Unidade formadora de colônias (CFU)	19
3.2.2 Proliferação celular	20
3.2.3 Expressão gênica	20
3.2.4 Expressão proteica	22
3.2.5 Atividade de ALP	25
3.2.6 Formação de matriz extracelular mineralizada	25
3.2.7 Formação de acúmulo lipídico	26
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 CFU e proliferação celular	28
4.2 Expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica e adipocítica em CTMs crescidas em condições não indutoras de diferenciação	29
4.3 Diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas em condições osteogênicas.....	31
4.4 Diferenciação adipocítica de CTMs crescidas em condições adipogênicas	33
4.5 Efeito de adipócitos sobre a diferenciação osteoblástica.....	35
4.6 Efeito de osteoblastos sobre a diferenciação adipocítica.....	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos milhões de pessoas sofrem com perdas de tecidos e/ou órgãos para as quais os tratamentos mais comumente empregados são o transplante de órgãos, a reconstrução cirúrgica ou a utilização de aparatos mecânicos (GOLDSTEIN et al., 2012; PEPPER, 2012; ZHENG et al., 2012). Tais terapias têm salvado e melhorado a qualidade de vida de muitos pacientes; no entanto, não caracterizam ainda a abordagem ideal. Os transplantes são limitados pela pequena quantidade de doadores viáveis, as cirurgias reconstrutivas podem necessitar de um sítio doador de tecido e resultar em problemas a longo prazo e os aparatos mecânicos não são capazes de realizar todas as funções de um órgão e, portanto, não interrompem a deterioração progressiva do paciente. Nesse contexto, novas abordagens terapêuticas têm sido propostas e amplamente discutidas na literatura, como a terapia celular e a engenharia de tecidos.

A Sociedade Americana de Terapia Gênica e Celular define a terapia celular como “o transplante de células para um paciente com o objetivo de tratar uma patologia hereditária ou adquirida”. A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que emprega os princípios de engenharia e biologia para o desenvolvimento de substitutos biológicos para manter, restaurar ou melhorar as funções do tecido (NEREM, 1991; LANGER e VACANTI, 1993). As estratégias desenvolvidas incluem o transplante de células-tronco, manipulação das próprias células do paciente e uso de arcabouços e de fatores de crescimento que aceleram processos regenerativos (IKADA, 2006). Tanto a terapia celular quanto a engenharia de tecidos têm sido avaliadas como tratamentos potenciais para o reparo de tecido ósseo, com aplicação nas áreas odontológica e médica, e a seleção da população celular adequada é fator chave para o sucesso dessas terapias (ROSA et al., 2008;

BAIGUERA et al., 2012).

O termo células-tronco foi utilizado pela primeira vez em 1868 por Ernst Haeckel, sendo posteriormente incluídos os conceitos de auto-renovação e diferenciação celular e finalmente, na área de hematopoiese, o de pluripotência (MAEHLE, 2011). As células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTEs) ou células-tronco adultas (CTAs) de acordo com sua origem (RYAN et al., 2005). As CTEs são células pluripotentes com potencial ilimitado de auto-renovação e diferenciação, sendo obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto (EVANS e KAUFMAN, 1981; THOMSON et al., 1998). As CTAs podem ser encontradas praticamente em todos os tecidos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase e integridade tecidual (BOYETTE e TUAN, 2014). Geralmente, as CTAs são multipotentes, ou seja, dão origem apenas a células do seu folheto germinativo de origem, sendo mais limitadas quanto à potencialidade de diferenciação quando comparadas às CTEs. No entanto, as CTAs são mais facilmente obtidas, uma vez que não envolve a utilização de embriões, minimizando assim questões éticas e religiosas (MESKUS e DE MIGUEL BERIAIN, 2013). Dentre as CTAs, destacam-se as células-tronco mesenquimais (CTMs) ou células estromais mesenquimais multipotentes (HORWITZ et al., 2005). As CTMs da medula óssea de ratos foram caracterizadas como células não fagocíticas, não hematopoiéticas, clonogênicas, formadoras de colônias semelhantes às de fibroblastos e com capacidade de diferenciação em células dos tecidos ósseo, adiposo, cartilaginoso e conjuntivo (FRIEDENSTEIN et al., 1966; FRIEDENSTEIN et al., 1968; FRIEDENSTEIN et al., 1974).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu três critérios para definir e caracterizar as CTMs, independentemente da fonte de isolamento, (1)

aderência a superfícies plásticas, (2) potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica e (3) expressão de moléculas específicas tais como CD105, CD73 e CD90 na superfície celular (DOMINICI et al., 2006). Assim as CTMs geralmente são isoladas a partir do aspirado de medula óssea (CTMs-MO) por gradiente de densidade e aderência ao plástico (GNECCHI e MELO, 2009). No entanto, considerando o procedimento de obtenção altamente invasivo, doloroso e com baixa incidência de CTMs (1 CTM a cada 100.000 células nucleadas) (DEANS e MOSELEY, 2000), outras fontes de CTMs têm sido investigadas tais como placenta humana (IN 'T ANKER et al., 2004), sangue do cordão umbilical (ERICES et al., 2000), cordão umbilical, geleia de Wharton (TROYER e WEISS, 2008), fluído amniótico (MARESCHI et al., 2009), âmnio (HAN et al., 2008), diversos tecidos fetais como fígado, baço e pulmão (CAMPAGNOLI et al., 2001), além de tecidos adultos como o epitelial, muscular e adiposo (WITKOWSKA-ZIMNY e WALENKO, 2011; ARWERT et al., 2012).

A existência de CTMs derivadas de tecido adiposo (CTMs-TA) foi descrita pela primeira vez em 2001 (ZUK et al., 2001). O tecido adiposo, assim como a medula óssea, é derivado do mesênquima, sendo uma fonte de CTMs interessante, visto que o tecido adiposo subcutâneo pode ser obtido em grandes quantidades por meio de procedimentos minimamente invasivos, como a lipoaspiração, comparados à aspiração de medula óssea (KERN et al., 2006). Tem sido sugerido que ambas populações CTMs-MO e CTMs-TA seriam idênticas (DOMINICI et al., 2006), apresentando capacidades semelhantes de diferenciação nas linhagens osteoblástica e adipocítica (HALVORSEN et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2005; KERN et al., 2006; PENG et al., 2008).

O processo de diferenciação osteoblástica a partir de CTMs inicia-se com o comprometimento osteoblástico das células osteoprogenitoras, assim denominadas as CTMs que entram em contato com fatores osteogênicos (AUBIN, 1998; LONG, 2001). Em seguida, ocorre a transição para pré-osteoblastos, dirigida pelo fator de transcrição RUNX2 (Runt related transcription factor 2), presente até o final da diferenciação osteoblástica (KOMORI, 2006). Níveis de proteínas como a fosfatase alcalina (ALP) são gradualmente aumentados durante a maturação osteoblástica (QUARLES et al., 1992; LONG et al., 1995; GRONTHOS et al., 1999) e, finalmente, a expressão de osteocalcina e a mineralização da matriz extracelular, definem o fenótipo osteoblástico. (HUANG et al., 2007; HOEMANN et al., 2009).

O processo de diferenciação adipocítico a partir de CTMs é tipicamente descrito em duas fases, a fase de determinação e a fase de diferenciação terminal. Na fase de determinação as CTMs se comprometem com a linhagem adipocítica e perdem o potencial de diferenciação para outras linhagens, ou seja, são consideradas pré-adipócitos que morfologicamente são indistinguíveis dos seus precursores. Durante a fase terminal de diferenciação os pré-adipócitos sofrem alteração da morfologia fibroblastóide para esférica, começam a sintetizar proteínas e apresentam sensibilidade à insulina (ROSEN e MACDOUGALD, 2006). Funcionalmente, a adipogênese é conduzida por uma complexa cascata de sinalização intracelular, cujo principal fator de transcrição, o PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (ROSEN et al., 2000) tem como alvo o gene FABP4 ou proteína adipocítica 2 (aP2) (GARIN-SHKOLNIK et al., 2014), o marcador da diferenciação adipocítica terminal (BERNLOHR et al., 1984).

Considerando a finalidade terapêutica, é de fundamental importância determinar o potencial de diferenciação das CTMs em células de um tecido específico.

Resultados de diferentes estudos são discrepantes, já que o potencial adipogênico e osteogênico não está diretamente correlacionado com a fonte celular. Investigações distintas mostram que as CTMs-MO podem apresentar um maior, menor ou o mesmo potencial osteogênico comparadas às CTMs-TA (HATTORI et al., 2004; SAKAGUCHI et al., 2005; REBELATTO et al., 2008). Adicionalmente, tem sido sugerido que as CTMs estão comprometidas com o tecido de origem como as CTMs derivadas de periósteo que seriam mais osteogênicas e as CTMs-TA que seriam mais adipogênicas (SAKAGUCHI et al., 2005; PACHON-PENA et al., 2011).

Além da capacidade de diferenciação, a intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos é relevante para determinar o potencial osteogênico e/ou adipogênico de uma população celular. Clinicamente, a maioria das condições associadas com perda óssea, como envelhecimento e osteoporose, são acompanhadas do aumento da quantidade de tecido adiposo na medula óssea (CHAN e DUQUE, 2002; TCHKONIA et al., 2002). O contrário, o aumento da massa óssea provocada por situações patológicas, como uma mutação no receptor Lrp5, leva à redução da massa de tecido adiposo na medula óssea (QIU et al., 2007). Essa relação inversa entre as massas de tecido ósseo e adiposo pode estar relacionada com a maior diferenciação osteoblástica em detrimento da diferenciação adipocítica e vice-versa (GIMBLE et al., 2006; ABDALLAH e KASSEM, 2012). Corroborando essa hipótese, fatores que induzem a diferenciação osteoblástica de CTMs inibem a diferenciação adipocítica e compostos que favorecem a diferenciação adipocítica reduzem a diferenciação osteoblástica (BERESFORD et al., 1992; GIMBLE et al., 1995; NUTTALL e GIMBLE, 2004; PEI e TONTONNOZ, 2004; FALCONI et al., 2007; KANG et al., 2007). Entre os fatores derivados de adipócitos, os estrógenos e adipocinas têm efeitos sobre a diferenciação osteoblástica, tendo sido demonstrado que o

estradiol induz a diferenciação osteogênica e adipogênica de pré-osteoblastos enquanto a adiponectina inibe a diferenciação osteoblástica (OKAZAKI et al., 2002; SHINODA et al., 2006). Em relação aos fatores secretados por osteoblastos, foi observado que a osteocalcina favorece o transporte de glicose e a liberação de adiponectina em culturas adipocíticas (HILL et al., 2014).

Considerando que a diferenciação a partir de CTMs em osteoblastos e adipócitos é dirigida por complexas inter-relações entre diversas vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição específicos, como o RUNX2 para os osteoblastos e PPAR γ para adipócitos, é importante investigar o potencial osteogênico e adipogênico de CTMs-MO e CTMs-TA, assim como o efeito da intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos na expressão dos fenótipos osteoblástico e adipocítico.

2 PROPOSIÇÃO

Investigar o potencial osteogênico e adipogênico de CTMs-MO e CTMs-TA, assim como o efeito da intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos na expressão dos fenótipos osteoblástico e adipocítico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com descartes de ratos utilizados em outro estudo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 11.1.890.53.0 (Anexo 1).

3.1 Obtenção e cultura de células

3.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO

As CTMs foram isoladas de medula óssea de fêmures de ratos *Wistar* com massa corporal variando entre 250 e 300 g, como descrito previamente (Maniatopoulos *et al.* 1988). Os ratos foram eutanasiados com sobredose de anestésico Ketamina (Agener União, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xylazina (Dopaser-Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil) e os fêmures, retirados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, Grand Island, Nova Iorque, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea extraída por irrigação com meio de crescimento (condição não indutora de diferenciação celular) contendo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). As células da medula óssea foram mantidas em cultura durante 7 dias para permitir a seleção das CTMs, por aderência ao poliestireno e a expansão das culturas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, Nova Iorque, Nova Iorque, EUA). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA

As CTMs foram obtidas de tecido adiposo da região inguinal dos mesmos ratos utilizados para obtenção de medula óssea. Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) o tecido adiposo foi seccionado em fragmentos de

aproximadamente 3 mm³ e submetido à digestão enzimática em 20 mL de solução de colagenase II 0,075% (Gibco-Life Technologies) a 37°C, sob agitação constante por 40 minutos. Em seguida, foi adicionado igual volume de meio de crescimento para neutralizar a ação enzimática. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos e o tecido adiposo flutuante removido. O pellet foi resuspendido em meio de crescimento, e as células cultivadas por 7 dias para permitir a seleção das CTMs, por aderência ao poliestireno e a expansão das culturas em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

3.1.3 Cultura e diferenciação de CTMs-MO e CTMs-TA

Quando as culturas de células obtidas de medula óssea e tecido adiposo atingiram a subconfluência, o meio de cultura foi removido e adicionada solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), 1,3 mg/mL de colagenase II (Gibco-Life Technologies) e EDTA 1 mM (Gibco-Life Technologies) para obtenção da suspensão de células. Em seguida as células foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) em meio de crescimento, meio osteogênico composto por meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich), e meio adipogênico composto por meio de crescimento suplementado com dexametasona 10^{-6} M (Sigma-Aldrich), 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 µM (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e indometacina 0,1 M (Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas por períodos de até 21 dias e a progressão foi avaliada em microscópio de fase invertido (Axiovert 25 Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha). As

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

3.1.4 Cocultura

As CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas em meio de crescimento durante 4 dias, sendo trocado por meio osteogênico para a indução da diferenciação osteoblástica de CTMs-MO e por meio adipogênico para a indução da diferenciação adipocítica de CTMs-TA por outros 4 dias. Em seguida, as células foram liberadas com solução de EDTA 1mM, 1,3 mg/mL de collagenase e tripsina 0,25% (Gibo-Life Technologies) para o posterior plaqueamento na densidade 1×10^4 . Então as células foram cocultivadas (1:1) usando o filtro poroso Transwell de 0,4 µm (Corning Incorporated) em duas diferentes condições, (1) osteoblastos sob a influência de adipócitos em meio osteogênico e (2) adipócitos sob a influência de osteoblastos em meio adipogênico. Os osteoblastos e adipócitos não cocultivados foram utilizados como controle. Aos 3 dias, as células foram coletadas para avaliar os parâmetros descritos abaixo.

3.2 Avaliação das respostas celulares

3.2.1 Unidade formadora de colônias (CFU)

As CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas na densidade de 200 células/poço em placas de poliestireno de 6 poços (Corning Incorporated) em meios de crescimento, osteogênico e adipogênico. Aos 7 dias, as células foram fixadas com formalina 10% por 2 horas e, em seguida, coradas com cristal violeta 0,5% (Sigma-Aldrich) em metanol por 10 minutos à temperatura ambiente. O número de CFU contendo mais de 30 células foi contado em microscópio de luz (Axiovert 25 Zeiss) utilizando o aumento de 10X e expresso como CFU/poço.

3.2.2 Proliferação celular

Aos 4, 10 e 17 dias, células crescidas em meios de crescimento, osteogênico e adipogênico foram liberadas com solução contendo EDTA 1mM, 1,3 mg/mL de collagenase e tripsina 0,25% (Gibo-Life Technologies). Uma alíquota de 10 µL da suspensão de células foi adicionada a igual volume de azul de Trypan 0,1% (Acros Organics, Gell, Turnbout, Bélgica) para determinação do número de células viáveis (marcadas pelo azul de Trypan), usando um contador de células automático hemocitômetro (Invitrogen-Life Technologies, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e o resultado foi expresso como número de células/poço.

3.2.3 Expressão gênica

A expressão dos genes marcadores do fenótipo osteoblástico RUNX2, ALP e osteocalcina e do fenótipo adipocítico PPAR γ , aP2 e resistina foi avaliada aos 4, 10 e 17 dias por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR). Para tanto, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen-Life Technologies) à temperatura ambiente, por 5 minutos, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro Nanovue plus (GE Healthcare, Uppsala, Condado de Uppsala, Suécia) e sua integridade, avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich). Para o preparo da água, foi adicionado 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada à temperatura ambiente por 24 horas e autoclavada por 30 minutos. O gel

foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco-Life Technologies) em 144 mL de água DEPC. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65 °C e, então, foram adicionados 36 mL de formaldeído 12,3 M (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7 µL de GelRed (Biotium Inc., EUA) e 20 mL de tampão de corrida, constituído de 50 mM de acetato de sódio (Merck), 5 mM de EDTA (Merck) e 100 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich). A mistura foi despejada em fôrmas adequadas para moldagem do gel. Para o preparo das amostras, foram adicionados 3 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida, 4 µL de formaldeído 12,3 M e 10 µL de formamida (Merck). Esta mistura foi aquecida a 85 °C por 10 minutos e, posteriormente, submetida a resfriamento a 4 °C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado o tampão de amostra, composto por 50% de glicerol (v/v), 0,25% de azul de bromofenol (m/v), 0,25% de xileno cianol (m/v) e 10 nM de EDTA em água DEPC. A eletroforese foi conduzida a 60 V durante 1 a 3 horas, utilizando-se tampão de corrida. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta a 300 nm. A integridade do RNA foi verificada pela visualização de duas subunidades (18S e 28S) do RNA ribossômico presentes em organismos eucariotos. Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Para a reação de Real-time PCR, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para genes-alvo em aparelho CFX96 (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA). As reações foram realizadas em triplicata (n=3), utilizando 5 µL de Taqman Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de Taqman Gene Expression Master Mix (Sondas + Primers) e

4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistiram em 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene beta actina (ACTB). A expressão do controle endógeno foi utilizada para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda Taqman utilizada. O método comparativo de 2-ddCt (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das culturas dos diferentes grupos experimentais.

3.2.4 Expressão proteica

A expressão proteica de RUNX2 e PPAR γ foi realizada por Western blot aos 10 dias. Para tanto, as células foram destacadas dos poços como já descrito anteriormente, e as amostras foram homogeneizadas, transferidas para tubos falcon (Corning Incorporated) e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células, lavadas 3 vezes com 5-10 mL de PBS aquecido. Após a última centrifugação, todo o PBS foi removido, e foi adicionado o tampão RIPA (NaCl 150 mM, Sigma-Aldrich; NP40 10%, Sigma-Aldrich; C24H39O4Na 0,5%, Sigma-Aldrich; SDS 0,1%, Sigma-Aldrich; e Tris base 50 mM, pH 8, Sigma-Aldrich). A extração da proteína total foi realizada por lise celular, utilizando-se aparelho de ultrassom (Misonix, Farmingdale, Nova Iorque, EUA) com 5 pulsos de 10 segundos e

intervalos de 10 segundos entre os pulsos. Primeiramente, determinou-se a concentração de proteínas das amostras, $\mu\text{g/mL}$, pelo método de quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976), utilizando o kit comercial Protein Assay (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro μQuant (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA), com comprimento de onda de 750 nm. Foram preparados géis de poliacrilamida 8,5% para separação das proteínas, contendo, para um volume final de 10 mL: 2,84 mL de acrilamida, 2,60 mL de tampão Tris 1,5%, pH 6,8 e SDS 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 μL de Temed e 75 μL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics, Charlotte, Carolina do Norte, EUA). Após a polimerização do gel de separação, foi confeccionado o gel de empilhamento 5%, contendo, para um volume final de 5 mL: 0,83 mL de acrilamida, 0,13 mL de tampão Tris HCl, pH 6,8 e SDS 10%, 3,44 mL de água destilada, 12 μL de Temed e 20 μL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics). Após sua polimerização, os géis foram montados em aparato próprio e foi adicionado o tampão de corrida, composto por 3,01 g de Tris base (Roche Applied Science, Indianápolis, Indiana, EUA); 14,4 g de glicina (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA) e 1 g de SDS (Sigma, EUA), para um volume final de 1 L de água destilada. Para o ensaio, 50 μg de proteína de cada grupo, contidos em um volume final de 20 μL , foram misturadas com 5 μL de tampão de amostra, contendo 7 mL de Tris base pH 6,8 (Roche Applied Science), 3 mL de glicerol (Sigma-Aldrich), 1 g de SDS (Sigma-Aldrich), 0,93 g de DTT (Sigma-Aldrich), 1,2 mg de bromofenol (Sigma-Aldrich) e 10 mL de água destilada e β -mercaptoetanol. Após aquecimento em banho-maria a 100 °C por 5 minutos, as amostras foram aplicadas nos géis, e a separação das proteínas, realizada por eletroforese com aplicação de 100 V/hora. Como referência para identificação do

peso molecular das proteínas separadas, foi utilizado um marcador que identifica bandas entre 10 e 250 kDa (BioRad). As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Hybond C-Extra, GE Healthcare, Piscataway, Nova Jersey, EUA) com o aparelho Trans-Blot SD (BioRad), operado em 12 V por 45 minutos. As membranas foram submetidas a três incubações à temperatura ambiente, sendo, (1) bloqueio dos sítios inespecíficos por 3 horas, com leite desnatado 5% diluído em Tampão Salino de Tris com Tween 20 (TBS-T), composto por 2,43 g de Tris, (Roche), 8 g de NaCl, (Sigma-Aldrich), 1 mL de Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 7,6, (2) incubação, por 3 horas, com o anticorpo primário anti-RUNX2 (1:500, policlonal de coelho; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA) ou anti-PPAR γ (1:500; policlonal de coelho; Santa Cruz Biotechnology) diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T e (3) incubação, por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000, cabra anti-coelho IgG HRP; Sigma-Aldrich) diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T. Ao final de cada incubação, as membranas foram lavadas três vezes, por 10 minutos cada, com TBS-T. Por fim, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA) por 1 minuto e transferidas para o aparelho G:BOX (SynGene, Los Altos, Califórnia, EUA). Para a captação de imagens da banda relativa às proteínas RUNX2 e PPAR γ foi utilizado o programa GeneSnap (SynGene). Como proteína constitutiva, foi utilizado GAPDH. Para isso, as membranas foram submetidas a tratamento com solução Re-blot plus mild (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) por 20 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção dos anticorpos, e então incubadas de acordo com os procedimentos previamente descritos, utilizando-se anticorpo primário anti-GAPDH (1:1000, policlonal de coelho, Santa Cruz

Biotechnology) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000, cabra anti-coelho IgG HRP; Sigma-Aldrich).

3.2.5 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada aos 4, 10 e 17 dias em lisados de células pela da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, Diagnostica SA, Lagoa Santa, Belo Horizonte, Brasil). Para obtenção dos lisados de células, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco-Life Technologies) aquecida a 37 °C, preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich) e ao final de 30 minutos, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL dessa solução foram transferidos para os tubos de ensaio. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Todos os tubos foram incubados a 37 °C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Aliquotas de 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning Incorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm no espectrofotômetro µQuant (BioTek). A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total, obtida a partir dos mesmos lisados celulares de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951), e expressa como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.2.6 Formação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada aos 21 dias pela marcação com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich). Para tanto, o meio de cultura

foi removido e as culturas fixadas em álcool etílico 70% a 4 °C por 60 minutos e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos e novamente lavadas com PBS e água bidestilada. Para análise qualitativa, imagens macroscópicas foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8, EUA). Para a análise quantitativa, foi realizada a extração do vermelho de alizarina. Para isso, foram acrescentados em cada poço 280 µL de ácido acético 10% e as placas, deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85 °C por 10 minutos e transferidos para o gelo por 5 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 13000 g por 20 minutos e 100 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços (Corning Incorporated) contendo 40 µL de hidróxido de amônia 10%. Por fim, a absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek) utilizando comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz extracelular mineralizada foi expressa como absorbância.

3.2.7 Formação de acúmulo lipídico

A formação de acúmulo lipídico foi avaliada aos 21 pela marcação do óleo vermelho (Sigma-Aldrich). Para tanto, CTMs derivadas de medula óssea e de tecido adiposo cultivadas em condições adipogênicas foram lavadas em PBS e fixadas com formalina 10% por 1 hora. Em seguida, foram lavadas com isopropanol 60% e coradas com óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) 2% por 15 minutos à temperatura ambiente. A quantificação foi realizada por extração do conteúdo lipídico corado pelo óleo vermelho O. Em cada poço foram acrescentados 750 µL de isopropanol 100% (Merck) e as placas foram mantidas sob agitação por 10 minutos. A solução obtida

foi transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos e utilizadas para a leitura em espectrofotômetro μ Quant (BioTek) em um comprimento de onda de 500 nm. A formação de acúmulo lipídico foi expressa como absorbância.

3.3 Análise estatística

Os dados apresentados no presente trabalho são representativos de 4 experimentos diferentes usando culturas de quatro diferentes pools de ratos. Os experimentos relativos a CFU, proliferação celular, atividade de ALP, matriz extracelular mineralizada e acúmulo lipídico foram realizados em quintuplicada ($n=5$) e a expressão gênica, em triplicata ($n=3$). Os dados obtidos em três períodos foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis (KW) seguido pelo pós-teste Student Newman Keuls para comparar CTMs-MO com CTMs-TA. Os dados obtidos em um período foram analisados usando o teste de Mann-Whitney (MW) para comparar CTMs-MO com CTMs-TA, assim como osteoblastos em cocultura com osteoblastos cultivados sozinhos ou adipócitos em cocultura com adipócitos cultivados sozinhos. Para todos os experimentos o nível de significância foi estabelecido com o valor de $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 CFU e proliferação celular

O número de CFU aos 7 dias não foi afetado pela origem das células, independentemente dos meios de cultura, crescimento, osteogênico ou adipogênico (MW; $p=0.1$) (Fig. 1A-C). O número células foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA em meio de crescimento (Fig. 1D) e adipogênico (Fig. 1F) aos 4, 10 e 17 dias (KW; $p<0.05$). O número de células foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA em meio osteogênico aos 10 dias (KW; $p<0.05$), sem diferença estatística aos 4 e 17 dias (KW; $p>0.05$) (Fig. 1E).

Figura 1. Unidade formadora de colônias (CFU) (A-C) e proliferação (D-F) de CTMs cultivadas em meio de crescimento (A-D), osteogênico (B, E) e adipogênico (C, F). O número de células foi menor para CTMs-MO comparadas com CTMs-TA crescidas em meio de crescimento (D) e adipogênico (E) aos 4 e 17 dias. O número de células foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA crescidas em meio osteogênico (E) aos 10 dias. Todos os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). * indica diferença estatisticamente significante.

4.2 Expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica e adipocítica em CTMs crescidas em condições não indutoras de diferenciação

Em células cultivadas em condições não indutoras, a expressão gênica de RUNX2 não foi afetada pela origem das células em todos os períodos avaliados (KW; $p < 0.05$) (Fig. 2A). Foi observada menor expressão gênica de ALP em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4, 10 e 17 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 2C). A expressão gênica de osteocalcina foi maior aos 10 dias e menor aos 17 dias (KW; $p < 0.05$) em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA, sem diferença estatisticamente significativa aos 4 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 2E). A expressão gênica de PPAR γ foi menor aos 4 e 10 dias e maior aos 17 dias em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA (KW; $p < 0.05$) (Fig. 2B). Foi observada uma menor expressão gênica de aP2 em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4 e 17 dias (KW; $p < 0.05$), sem diferença estatisticamente significativa aos 10 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 2D). A expressão de resistina foi menor aos 4 dias e maior aos 10 e 17 dias (KW; $p < 0.05$) em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA (Fig. 2F).

Meio de Crescimento

Figura 2. Expressão gênica de marcadores ósseos (A, C, E) e adiposos (B, D, F) de CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio de crescimento. A expressão de ALP (C) foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4, 10 e 17 dias. Maior expressão de osteocalcina (D) aos 10 dias e menor aos 17 dias foi observada em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA. A expressão de PPAR γ (B) foi menor aos 4 e 10 dias e maior aos 17 dias em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA. Menor expressão de aP2 (D) foi observada em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4 e 17 dias. A expressão de resistina foi maior aos 4 dias e menor aos 10 e 17 dias em culturas de CTMs-TA comparadas com CTMs-MO. Todos os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significativa.

4.3 Diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas em condições osteogênicas

Em condições osteogênicas, a expressão de RUNX2 (Fig. 3A), ALP (Fig. 3C) e osteocalcina (Fig. 3E) foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4, 10 e 17 dias (KW; $p < 0.05$). Igualmente, a atividade de ALP aos 4, 10 e 17 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 3B), expressão proteica de RUNX2 aos 10 dias (Fig. 3D) e formação de matriz mineralizada aos 21 dias (MW; $p = 0.029$) (Fig. 3F) foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA.

Meio osteogênico

Figura 3. Diferenciação osteoblástica de CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio osteogênico. A expressão gênica dos marcadores ósseos RUNX2 (A), ALP (C) e osteocalcina (E) foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4, 10 e 17 dias. A atividade de ALP aos 4, 10 e 17 dias, a expressão proteica de RUNX2 (D) aos 10 dias e formação de matriz mineralizada (F) aos 21 dias foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA. Os dados da expressão gênica (n=3), atividade de ALP (n=5) e matriz mineralizada (n=5) são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. * indica diferença estatisticamente significativa.

4.4 Diferenciação adipocítica de CTMs crescidas em condições adipogênicas

Em condições adipogênicas, a expressão de PPAR γ foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 4, 10 e 17 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 4A). A expressão de aP2 aos 4 e 10 dias foi menor e aos 17 dias maior (KW; $p < 0.05$) em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA (Fig. 4C). Aos 10 e 17 dias a expressão gênica de resistina foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA (KW; $p < 0.05$), sem diferença estatisticamente significativa aos 4 dias (KW; $p < 0.05$) (Fig. 4E). A expressão proteica de PPAR γ aos 10 dias (Fig. 4B) e o acúmulo lipídico em 21 dias (Fig. 4D) foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA (MW; $p = 0.002$).

Figura 4. Diferenciação adipocítica de CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio adipogênico. A expressão gênica dos marcadores adipogênicos PPAR γ (A) aos 4, 10 e 17 dias, proteína adipocítica 2 (C) aos 4 dias e 10 dias e resistina (E) aos 10 e 17 dias foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA. A expressão de aP2 (C) foi maior em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA aos 17 dias. A expressão proteica de PPAR γ (B) aos 10 dias e o acúmulo lipídico (E) aos 21 dias foi menor em culturas de CTMs-MO comparadas com CTMs-TA. Os dados da expressão gênica (n=3) são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. * indica diferença estatisticamente significante.

4.5 Efeito de adipócitos sobre a diferenciação osteoblástica

Em condições osteogênicas, os adipócitos em cocultura com osteoblastos inibiram a expressão do fenótipo osteoblástico evidenciado pela redução da expressão gênica de RUNX2 (MW; $p=0.029$) (Fig. 5A), ALP (MW; $p=0.029$) (Fig. 5C) e osteocalcina (MW; $p=0.029$) (Fig. 5E) e da expressão proteica de RUNX2 (Fig. 5B) aos 10 dias, além de uma menor formação de matriz mineralizada aos 21 dias (MW; $p=0.029$) (Fig. 5D), comparados com osteoblastos crescidos na ausência de adipócitos.

Figura 5. Efeito de adipócitos (ADs) diferenciados a partir de CTMs-TA sobre osteoblastos (OBs) diferenciados a partir de CTMs-MO cultivados em meio osteogênico. A expressão dos marcadores ósseos RUNX2 (A), ALP (C) e osteocalcina (E) e a expressão proteica de RUNX2 (B), aos 10 dias, e a formação de matriz extracelular mineralizada (D) aos 21 dias foi reduzida pela presença de adipócitos. Os dados de expressão gênica (n=3), atividade de ALP (n=5) e formação de matriz extracelular mineralizada (n=5) são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. * indica diferença estatisticamente significativa.

4.6 Efeito de osteoblastos sobre a diferenciação adipocítica

Em condições adipogênicas, os osteoblastos em cocultura com adipócitos exerceram um efeito complexo sobre a expressão do fenótipo adipocítico, já que aos 10 dias a expressão gênica de PPAR γ (MW; $p=0.029$) (Fig. 6A) e resistina (MW; $p=0.029$) (Fig. 6E) foi aumentada enquanto a de aP2 (MW; $p=0.029$) (Fig. 6C) foi reduzida comparados com adipócitos crescidos na ausência de osteoblastos. Adicionalmente, a expressão proteica de PPAR γ foi reduzida aos 10 dias (Fig. 6B) e o acúmulo lipídico aos 21 dias não foi afetado pela presença de osteoblastos (MW; $p=0.114$) (Fig. 6D).

Meio adipogênico

Figura 6. Efeito de osteoblastos (OBs) diferenciados a partir de CTMs-MO sobre adipócitos (ADs) diferenciados a partir de CTMs-TA cultivados em meio adipogênico. A expressão gênica dos marcadores adiposos PPAR γ (A) e resistina (E) maior na presença de OBs aos 10 dias. A expressão gênica da proteína adipocítica 2 (B) e a expressão proteica de PPAR γ foi reduzida na presença de osteoblastos aos 10 dias. A formação de acúmulo lipídico aos 21 dias não foi afetada pela presença de osteoblastos. Os dados da expressão gênica (n=3) e acúmulo lipídico (n=5) são apresentados com media $\pm$ desvio padrão. * indica diferença estatística significante

5 DISCUSSÃO

Os dados da literatura são controversos em relação ao potencial osteogênico e adipogênico de CTMs derivadas de diferentes tecidos. No presente estudo foi demonstrado que CTMs-MO e CTMs-TA são capazes de se diferenciarem tanto em osteoblastos quanto em adipócitos; no entanto, as CTMs-MO exibem maior potencial osteogênico e as CTMs-TA maior potencial adipogênico. Adicionalmente, foi observado que a intercomunicação entre adipócitos e osteoblastos inibe a diferenciação osteoblástica, não apresentando efeito marcante sobre diferenciação adipocítica.

A capacidade de formar colônias e de expansão em condições *in vitro* é uma característica própria das CTMs. Foi demonstrado que o número de colônias em culturas de CTMs-TA é até cem vezes maior, porém o número de células por colônia é menor quando comparadas às culturas de CTMs-MO (SAKAGUCHI et al., 2005). Com relação à proliferação celular, não foram observadas diferenças relevantes quando CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas tanto em condições não indutoras de diferenciação quanto em condições osteogênicas (HATTORI et al., 2004). No presente estudo, a formação de unidades de colônia não foi afetada pela origem das células, porém o número de células por colônia assim como o número total de células foi maior em culturas crescidas em condições não indutoras de diferenciação. Adicionalmente, as CTMs-MO apresentaram maior taxa de proliferação quando cultivadas em meio osteogênico mas não nos meios de crescimento e adipogênico, em que a taxa de proliferação das CTMs-TA foi maior. Conjuntamente, os resultados indicam que para o reparo do tecido ósseo baseado na terapia celular, previamente à indução da diferenciação osteoblástica, as células deveriam ser expandidas em condições não indutoras de diferenciação para gerar

um número de células adequado. Considerando que utilizamos células de ratos e nos estudos mencionados foram utilizadas células humanas, os resultados discrepantes podem ser atribuídos às características específicas de cada espécie.

Acerca da capacidade de diferenciação, resultados discrepantes têm sido relatados na literatura. Foi demonstrado que CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em condições semelhantes, são capazes se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos (PACHON-PENA et al., 2011). Corroborando este achado, no presente estudo foi demonstrado que em meio não indutor de diferenciação, as CTMs-MO e CTMs-TA exibem potenciais osteogênico e adipogênico confirmados pela expressão gênica de marcadores ósseos e adipocíticos. No entanto, quando as células foram cultivadas em meio osteogênico, as CTMs-MO apresentaram maior potencial osteogênico comparadas às CTMs-TA como mostrado pela maior expressão gênica e proteica de marcadores ósseos e formação de matriz extracelular mineralizada. Reciprocamente, em condições adipogênicas, as CTMs-TA exibiram maior expressão gênica e proteica de marcadores adipocíticos assim como maior acúmulo lipídico comparadas às CTMs-MO. Com base em resultados similares mostrando maior diferenciação osteoblástica e adipocítica para CTMs-MO e CTMs-TA, respectivamente, a hipótese de que as células preservam algumas características do tecido de origem tem sido proposta (SAKAGUCHI et al., 2005; POST et al., 2008; PACHON-PENA et al., 2011), a qual é apoiada pelos resultados obtidos no presente estudo.

Em termos de reparação óssea, a intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos é tão importante quanto o potencial de diferenciação celular, uma vez que ambos coexistem e interagem na medula óssea (ABDALLAH e KASSEM, 2012; SADIE-VAN GIJSEN et al., 2013). Tais interações devem ser levadas em

consideração na prática clínica visto que o aumento da adipogênese na medula óssea está correlacionada com a diminuição de densidade mineral óssea em modelos animais e em populações idosas e/ou osteoporóticas (DUQUE et al., 2004; DUQUE, 2008; LIU et al., 2011). Usando o modelo de cocultura indireta de osteoblastos e adipócitos, no presente estudo foi observado que os adipócitos inibem a diferenciação osteoblástica evidenciada pela regulação negativa da expressão gênica e proteica dos marcadores osteoblásticos e a redução da formação de matriz extracelular mineralizada. Este resultado pode ser, em parte, atribuído aos fatores secretados por adipócitos que afetam negativamente a expressão do fenótipo osteoblástico, como a adiponectina e o fator de necrose tumoral alfa (SHINODA et al., 2006; CLABAUT et al., 2010; LI et al., 2010). Adicionalmente, tem sido demonstrado que ratos knockout para PPAR γ no tecido adiposo exibem maiores atividade osteoblástica e formação óssea, sugerindo que adipócitos podem inibir as funções de osteoblastos inclusive em condições fisiológicas (AKUNE et al., 2004; COCK et al., 2004). Em relação à influência de osteoblastos sobre adipócitos, apesar de já ter sido demonstrado que a osteocalcina pode modular algumas atividades adipocíticas, nesse estudo não foram observados efeitos relevantes na diferenciação adipocítica (HILL et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi observado que CTMs-MO e CTMs-TA são capazes de diferenciação osteoblástica e adipocítica. Em condições indutoras apropriadas as CTMs-MO exibem maior potencial osteogênico enquanto as CTMs-TA exibem maior potencial adipogênico. Além disso, foi demonstrado que a intercomunicação entre osteoblastos e adipócitos inibe a diferenciação osteoblástica sem efeitos relevantes sobre a diferenciação adipocítica.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. **Bone**, v. 50, n. 2, p. 540-545, 2012.

AKUNE, T.; OHBA, S.; KAMEKURA, S.; YAMAGUCHI, M.; CHUNG, U. I.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; NAKAMURA, K.; KADOWAKI, T.; KAWAGUCHI, H. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **J Clin Invest**, v. 113, n. 6, p. 846-855, 2004.

ARWERT, E. N.; HOSTE, E.; WATT, F. M. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 3, p. 170-180, 2012.

AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol**, v. 76, n. 6, p. 899-910, 1998.

BAIGUERA, S.; JUNGEBLUTH, P.; MAZZANTI, B.; MACCHIARINI, P. Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements. **Transpl Int**, v. 25, n. 4, p. 369-382, 2012.

BERESFORD, J. N.; BENNETT, J. H.; DEVLIN, C.; LEBOY, P. S.; OWEN, M. E. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. **J Cell Sci**, v. 102 (Pt 2), p. 341-351, 1992.

BERNLOHR, D. A.; ANGUS, C. W.; LANE, M. D.; BOLANOWSKI, M. A.; KELLY, T. J., JR. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 17, p. 5468-5472, 1984.

BOYETTE, L. B.; TUAN, R. S. Adult Stem Cells and Diseases of Aging. **J Clin Med**, v. 3, n. 1, p. 88-134, 2014.

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

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.

CHAN, G. K.; DUQUE, G. Age-related bone loss: old bone, new facts. **Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 62-71, 2002.

CLABAUT, A.; DELPLACE, S.; CHAUVEAU, C.; HARDOUIN, P.; BROUX, O. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. **Differentiation**, v. 80, n. 1, p. 40-45, 2010.

COCK, T. A.; BACK, J.; ELEFTERIOU, F.; KARSENTY, G.; KASTNER, P.; CHAN, S.; AUWERX, J. Enhanced bone formation in lipodystrophic PPARgamma(hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. **EMBO Rep**, v. 5, n. 10, p. 1007-1012, 2004.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp Hematol**, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUQUE, G. Bone and fat connection in aging bone. **Curr Opin Rheumatol**, v. 20, n. 4, p. 429-434, 2008.

DUQUE, G.; MACORITTO, M.; KREMER, R. 1,25(OH)₂D₃ inhibits bone marrow adipogenesis in senescence accelerated mice (SAM-P/6) by decreasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPARgamma2). **Exp Gerontol**, v. 39, n. 3, p. 333-338, 2004.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

FALCONI, D.; OIZUMI, K.; AUBIN, J. E. Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 2, p. 305-312, 2007.

FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLASOVA, U. F.; KULAGINA, N. N.; PANASUK, A. F.; RUDAKOWA, S. F.; LURIA, E. A.; RUADKOW, I. A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY, S., II; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morphol**, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

GARIN-SHKOLNIK, T.; RUDICH, A.; HOTAMISLIGIL, G. S.; RUBINSTEIN, M. FABP4 attenuates PPARgamma and adipogenesis and is inversely correlated with PPARgamma in adipose tissues. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 900-911, 2014.

GIMBLE, J. M.; MORGAN, C.; KELLY, K.; WU, X.; DANDAPANI, V.; WANG, C. S.; ROSEN, V. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. **J Cell Biochem**, v. 58, n. 3, p. 393-402, 1995.

GIMBLE, J. M.; ZVONIC, S.; FLOYD, Z. E.; KASSEM, M.; NUTTALL, M. E. Playing with bone and fat. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 2, p. 251-266, 2006.

GNECCHI, M.; MELO, L. G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. **Methods Mol Biol**, v. 482, p. 281-294, 2009.

GOLDSTEIN, M. J.; LUBEZKY, N.; YUSHKOV, Y.; BAE, C.; GUARRERA, J. V. Innovations in organ donation. **Mt Sinai J Med**, v. 79, n. 3, p. 351-364, 2012.

GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A. C.; GRAVES, S. E.; OHTA, S.; HAY, S. J.; SIMMONS, P. J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. **J Bone Miner Res**, v. 14, n. 1, p. 47-56, 1999.

HALVORSEN, Y. D.; FRANKLIN, D.; BOND, A. L.; HITT, D. C.; AUCHTER, C.; BOSKEY, A. L.; PASCHALIS, E. P.; WILKISON, W. O.; GIMBLE, J. M. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. **Tissue Eng**, v. 7, n. 6, p. 729-741, 2001.

HAN, K.; LEE, J. E.; KWON, S. J.; PARK, S. Y.; SHIM, S. H.; KIM, H.; MOON, J. H.; SUH, C. S.; LIM, H. J. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy. **Cell Prolif**, v. 41, n. 5, p. 709-725, 2008.

HATTORI, H.; SATO, M.; MASUOKA, K.; ISHIHARA, M.; KIKUCHI, T.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; ISHIZUKA, T.; KIKUCHI, M.; FUJIKAWA, K.; ISHIHARA, M. Osteogenic

potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. **Cells Tissues Organs**, v. 178, n. 1, p. 2-12, 2004.

HILL, H. S.; GRAMS, J.; WALTON, R. G.; LIU, J.; MOELLERING, D. R.; GARVEY, W. T. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 5, p. 341-347, 2014.

HOEMANN, C. D.; EL-GABALAWY, H.; MCKEE, M. D. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathol Biol (Paris)**, v. 57, n. 4, p. 318-323, 2009.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A.; INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR, T. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUANG, Z.; NELSON, E. R.; SMITH, R. L.; GOODMAN, S. B. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro. **Tissue Eng**, v. 13, n. 9, p. 2311-2320, 2007.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J R Soc Interface**, v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

IN 'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, 2004.

KANG, S.; BENNETT, C. N.; GERIN, I.; RAPP, L. A.; HANKENSON, K. D.; MACDOUGALD, O. A. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Biol Chem**, v. 282, n. 19, p. 14515-14524, 2007.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KOMORI, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 5, p. 1233-1239, 2006.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LI, W.; YU, B.; LI, M.; SUN, D.; HU, Y.; ZHAO, M.; CUI, C. B.; HOU, S. NEMO-binding domain peptide promotes osteoblast differentiation impaired by tumor necrosis factor alpha. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 2, p. 1228-1233, 2010.

LIU, H. Y.; WU, A. T.; TSAI, C. Y.; CHOU, K. R.; ZENG, R.; WANG, M. F.; CHANG, W. C.; HWANG, S. M.; SU, C. H.; DENG, W. P. The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6773-6780, 2011.

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

LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells Mol Dis**, v. 27, n. 3, p. 677-690, 2001.

LONG, M. W.; ROBINSON, J. A.; ASHCRAFT, E. A.; MANN, K. G. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. **J Clin Invest**, v. 95, n. 2, p. 881-887, 1995.

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

MAEHLE, A. H. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. **Notes Rec R Soc Lond**, v. 65, n. 4, p. 359-378, 2011.

MARESCHI, K.; RUSTICHELLI, D.; COMUNANZA, V.; DE FAZIO, R.; CRAVERO, C.; MORTERRA, G.; MARTINOGLIO, B.; MEDICO, E.; CARBONE, E.; BENEDETTO, C.; FAGIOLI, F. Multipotent mesenchymal stem cells from amniotic fluid originate neural precursors with functional voltage-gated sodium channels. **Cytotherapy**, v. 11, n. 5, p. 534-547, 2009.

MESKUS, M.; DE MIGUEL BERIAIN, I. Embryo-like features of induced pluripotent stem cells defy legal and ethical boundaries. **Croat Med J**, v. 54, n. 6, p. 589-591, 2013.

NEREM, R. M. Cellular engineering. **Ann Biomed Eng**, v. 19, n. 5, p. 529-545, 1991.

NUTTALL, M. E.; GIMBLE, J. M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 290-294, 2004.

OKAZAKI, R.; INOUE, D.; SHIBATA, M.; SAIKA, M.; KIDO, S.; OOKA, H.; TOMIYAMA, H.; SAKAMOTO, Y.; MATSUMOTO, T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2349-2356, 2002.

PACHON-PENA, G.; YU, G.; TUCKER, A.; WU, X.; VENDRELL, J.; BUNNELL, B. A.; GIMBLE, J. M. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 3, p. 843-851, 2011.

PEI, L.; TONTONNOZ, P. Fat's loss is bone's gain. **J Clin Invest**, v. 113, n. 6, p. 805-806, 2004.

PENG, L.; JIA, Z.; YIN, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; CHEN, P.; MA, K.; ZHOU, C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem Cells Dev**, v. 17, n. 4, p. 761-773, 2008.

PEPPER, J. R. Update on mechanical circulatory support in heart failure. **Heart**, v. 98, n. 8, p. 663-669, 2012.

POST, S.; ABDALLAH, B. M.; BENTZON, J. F.; KASSEM, M. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 32-39, 2008.

QIU, W.; ANDERSEN, T. E.; BOLLERSLEV, J.; MANDRUP, S.; ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 11, p. 1720-1731, 2007.

QUARLES, L. D.; YOHAY, D. A.; LEVER, L. W.; CATON, R.; WENSTRUP, R. J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. **J Bone Miner Res**, v. 7, n. 6, p. 683-692, 1992.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETAO, M. P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.;

MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 125-128, 2005.

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

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 12, p. 885-896, 2006.

ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes Dev**, v. 14, n. 11, p. 1293-1307, 2000.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J Inflamm (Lond)**, v. 2, p. 8, 2005.

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

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 8, p. 2521-2529, 2005.

SHINODA, Y.; YAMAGUCHI, M.; OGATA, N.; AKUNE, T.; KUBOTA, N.; YAMAUCHI, T.; TERAUCHI, Y.; KADOWAKI, T.; TAKEUCHI, Y.; FUKUMOTO, S.; IKEDA, T.; HOSHI, K.; CHUNG, U. I.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 1, p. 196-208, 2006.

TCHKONIA, T.; GIORGADZE, N.; PIRTSKHALAVA, T.; TCHOUKALOVA, Y.; KARAGIANNIDES, I.; FORSE, R. A.; DEPONTE, M.; STEVENSON, M.; GUO, W.; HAN, J.; WALOGA, G.; LASH, T. L.; JENSEN, M. D.; KIRKLAND, J. L. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 5, p. R1286-1296, 2002.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591-599, 2008.

WITKOWSKA-ZIMNY, M.; WALENKO, K. Stem cells from adipose tissue. **Cell Mol Biol Lett**, v. 16, n. 2, p. 236-257, 2011.

ZHENG, G. S.; SU, Y. X.; LIAO, G. Q.; CHEN, Z. F.; WANG, L.; JIAO, P. F.; LIU, H. C.; ZHONG, Y. Q.; ZHANG, T. H.; LIANG, Y. J. Mandible reconstruction assisted by preoperative virtual surgical simulation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 5, p. 604-611, 2012.

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

ANEXOS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.890.53.0), intitulado "Efeito da Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno) Titanato de Bário sobre a Formação Óssea em Defeitos Criados em Calvárias de Ratos", de autoria de **Márcio Mateus Beloti**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.05.2012.

Colaborador: Adalberto Luiz Rosa

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.890.53.0), entitled: "Efeito da Membrana de Poli(Vinilideno-Trifluoretileno) Titanato de Bário sobre a Formação Óssea em Defeitos Criados em Calvárias de Ratos", by **Márcio Mateus Beloti**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, May, 5 2012.

Ribeirão Preto, 8 de maio de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro