

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA CAROLINA LOYOLA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES LOCAIS DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO  
NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS DE CALVÁRIA DE RATOS**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

ANA CAROLINA LOYOLA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE INJEÇÕES LOCAIS DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO  
NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS DE CALVÁRIA DE RATOS**

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

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral**

**Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

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

Barbosa, Ana Carolina Loyola

Avaliação da combinação de injeções locais de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração de defeitos ósseos de calvária de ratos.

55p: il; 30cm

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. células-tronco mesenquimais; 2. medula óssea; 3. tecido adiposo; 4. regeneração óssea; 5. terapia celular; 6. tecido ósseo.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**BARBOSA, Ana Carolina Loyola**

**Avaliação da combinação de injeções locais de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração de defeitos ósseos de calvária de ratos.**

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

**Programa: Biologia Oral**

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, Histologia, LAB 3D BIO e no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todas os momentos derramando bençãos e saúde sobre a mim, para que eu conseguisse alcançar mais um sonho.

Aos meus pais, Angela Maria Loyola Barbosa e Waldir Marcos Barbosa, pelo apoio, pelo amor incondicional, por sempre depositar fé e confiança em mim. Por serem um exemplo de companheirismo, amor, benevolência, perseverança e justiça.

Ao meu irmão, Bruno Loyola Barbosa, por sempre estar disponível para me ajudar, pelo incentivo, pelo companheirismo mesmo a distância e por acreditar no meu potencial.

A Família Loyola e a Família Barbosa, por sempre torcerem, vibrarem e ficarem igualmente felizes a cada conquista minha. Por estarem orando por mim e compreenderem o motivo da minha ausência nas festas, reuniões e cafés da tarde.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por ter me aceitado como orientanda e me permitir integrar o seu grupo de pesquisa, apostando em mim. O senhor sempre será para mim um exemplo de docente, pesquisador e dedicação a ser seguido. Agradeço por todos os ensinamentos, franqueza e paciência comigo.

Ao Prof. Dr. Marcio Mateus Beloti, primeiramente gostaria de ressaltar e agradecer pela gentileza, cordialidade e empatia que sempre me tratou, pouco vista em pesquisadores do seu patamar. Por sempre se demonstrar prestativo a me ajudar e me incentivar a crescer, mesmo que indiretamente. Obrigada por todos os conhecimentos até hoje transmitidos.

Ao Gileade Pereira Freitas, por me guiar pelos caminhos das pedras me ensinando tudo que eu precisava saber, por não manter o conhecimento apenas para você, por sempre está disponível para me ajudar; por confiar em mim; escutar minhas inquietações e impulsionar o meu crescimento profissional.

A Helena Bacha Lopes, ao Alann Thaffarell Portilho de Souza, agradeço por todas as palavras de ensinamentos, diálogos e serem um exemplo de dedicação.

Á Rayana Longo Bighetti Trevisan, que nos meus momentos de dificuldade me compreendeu, apresentou soluções e muitas vezes pegou na minha mão e me ensinou a fazer. Agradeço imensamente por te conhecido e por você ter me acolhido tão virtuosamente, por cada conhecimento, por sempre me fazer ver o lado bom das coisas, me animar e estimular a carreira acadêmica.

Aos amigos que conquistei, fizeram parte da minha jornada e da realização deste trabalho, Denise Weffort, Letícia Faustino Adolpho, Paola Gomes Souza, Gabriela Guaraldo Campos Tótolli, Maria Paula Oliveira Gomes, Georgia Kors Quiles e Isabella Cristine dos santos. Pela amizade, disponibilidade, pelas conversas e trocas. Eu nunca esquecerei do nosso grupo de força tarefa da cirurgia de defeito, vocês são incríveis cada um com suas qualidades. E ao Pós Doutorando Rodrigo Abuna, por sempre estar disponível a me ajudar e ensinar.

Ao Roger Rodrigo Fernandes, Fabíola Singaretti de Oliveira e Adriana Luísa Gonçalves de Almeida, pela disponibilidade, auxílio, paciência,

precisão e dedicação em me passar os ensinamentos envolvendo cultura de células, biologia molecular, microtomografia e histologia.

Aos todos os funcionários e técnicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, em especial, Imaculada Jainaira Miguel, pelo carinho, exemplar conduta e profissionalismo; e à Milla Sprone Tavares, pelas conversas, encontros, trocas e auxílio.

As entidades que deram apoio financeiro para execução deste trabalho, Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, por oportunizar o curso e a realização da pesquisa por meio de sua infraestrutura.

Ao Patrick Ferreira Daniel, pelo companheirismo e parceria em todos os momentos; por me ajudar a passar pelos meus medos e momentos difíceis sempre demonstrando muita empatia e afeto. Obrigada por todo carinho, por apostar e confiar no meu potencial.

E a todos que estiverem diretamente ou indiretamente envolvidos com a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!



## RESUMO

BARBOSA, ACL. **Avaliação da combinação de injeções locais de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração de defeitos ósseos de calvária de ratos.** 2021. 55f. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

A terapia celular é uma estratégia do arsenal disponível na Medicina Regenerativa para o tratamento de defeitos ósseos baseado no uso de células. Dentre as células que podem ser utilizadas, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são as mais estudadas devido à sua capacidade de renovação, efeitos parácrinos, imunomodulatórios e imunossupressores e diferenciação em osteoblastos. As fontes mais comuns de CTMs são a medula óssea (CTMs-MO) e o tecido adiposo (CTMs-TA) porque ambas induzem a formação de tecido ósseo. No entanto, como as CTMs-MO apresentam maior comprometimento com a diferenciação osteogênica enquanto as CTMs-TA parecem ser mais angiogênicas e ambos processos são fundamentais para regeneração óssea, nossa hipótese é que a terapia celular baseada na combinação de CTMs-MO e CTMs-TA induz maior formação óssea. Para tanto, as CTMs foram obtidas de medula óssea e de tecido adiposo, expandidas in vitro e caracterizadas por citometria de fluxo. Foram criados defeitos de 5mm de diâmetro em calvária de ratos e após 2 semanas foram injetadas localmente as combinações de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA, 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA, 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA, 100% CTMs-MO,

100% CTMs-TA e como controle negativo PBS sem células. Ao final de 8 semanas do tratamento, o tecido ósseo formado foi avaliado por microtomografia computadorizada e análise histológica. Os dados foram comparados por ANOVA, seguido dos pós teste Tukey, quando apropriado, considerando o nível de significância de 5%. A análise dos marcadores de superfície confirmou que ambas as células apresentavam perfil de expressão característico de CTMs. A combinação de 75%CTMs-MO/25%CTMs-TA, foi a mais efetiva em aumentar a formação óssea como comprovado por seis dos sete parâmetros microtomográficos com aumento do volume ósseo, volume ósseo/volume total, superfície óssea, número de trabéculas e densidade mineral óssea e redução na separação trabecular. Esse efeito foi confirmado pela análise histológica que revelou defeitos ósseos quase completamente reparados quando tratados com 75%CTMs-MO/25%CTMs-TA, mesmo não se observando diferenças histológicas no tecido ósseo formado em comparação com os outros tratamentos. Este efeito sinérgico entre CTMs-MO e CTMs-TA representa avanço na utilização de CTMs para a regeneração do tecido ósseo e abre futuras linhas de investigação em direção ao uso clínico da terapia celular.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, medula óssea, tecido adiposo, regeneração óssea, terapia celular, tecido ósseo.

## ABSTRACT

BARBOSA, ACL. **Evaluation of the combination of local injections of bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells in the regeneration of bone defects in rat calvaria.** 2021. 55p. Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2021.

Cell therapy is a strategy in regenerative medicine for the treatment of bone defects based on the use of cells. Among cells, mesenchymal stem cells (MSCs) have been widely studied due to their ability of self-renewal, potential of osteoblastic differentiation, and immunoregulatory properties. MSCs derived from bone marrow (BM-MSCs) or adipose tissue (AT-MSCs) are more often used because both may induce bone formation. However, BM-MSCs are more committed to the osteogenic differentiation process while AT-MSCs are more committed to the angiogenic differentiation process. As both processes are essential for bone regeneration, we hypothesize that cell therapy based on the combination of BM-MSCs and AT-MSCs can induce greater bone formation. For that, MSCs were obtained from bone marrow or adipose tissue of rats, cultured in vitro, and characterized by flow cytometry. Defects with 5-mm of diameter were created in rat calvaria and after 2 weeks, the combination of 50% BM-MSCs/50% AT-MSCs, 25% BM-MSCs/75% AT-MSCs, 75% BM-MSCs/25% AT-MSCs, 100% BM-MSCs, 100% AT-MSCs were locally injected. PBS without cells was used as the control group. At 8 weeks after the treatments, the bone tissue formed was evaluated by microtomography and histological analysis. The data were compared by ANOVA, followed by the Tukey post-test when appropriate ( $p \leq 0.05$ ). The results of flow cytometry confirmed that both BM-MSCs and AT-MSCs displayed the MSCs profile. The combination of 75% BM-MSCs/25% AT-MSCs was the most effective to increase bone formation as six out seven microtomographic parameters, bone volume, bone volume / total volume, bone surface, trabecular number, and

bone mineral density were increased, and trabecular separation was decreased. This effect was confirmed by histological analysis, in which bone defects were almost completely repaired when treated with 75% BM-MSCs/25% AT-MSCs, even though no histological differences were observed in the bone tissue formed compared to the other treatments. This synergistic effect of BM-MSCs and AT-MSCs represents an advance in the use of MSCs for bone tissue regeneration, opening new therapeutic possibilities for the treatment of bone defects.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue, bone regeneration, cell therapy, bone tissue.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reconstruções microtomográficas em 3D dos defeitos ósseos criados em calvária de ratos, tratados com injeções locais de PBS sem células (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) ao final de 8 semanas. ....33
- Figura 2.** Parâmetros morfométricos da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeções locais de PBS sem células (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) em 8 semanas.....35
- Figura 3.** Fotomicrografia por microscopia de luz de defeitos da calvária de ratos tratados com uma injeção local de PBS (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) em 8 semanas .....37

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Grupos de tratamento com injeções locais de células, CTMs-MO, CTMs-TA, em defeitos de calvária de ratos. Os defeitos receberam injeção de  $5 \times 10^6$  células/ 50  $\mu$ L de PBS. ....**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 2.** Valores em porcentagem (%) e mediana de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) expressando marcadores de superfície. ....32

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\alpha$ -MEM	Meio essencial mínimo modificação alfa
$\mu$ CT	Microtomografica
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CTMs-MO	Células-tronco mesenquimais da medula óssea
CTMs-TA	Células tronco mesenquimais do tecido adiposo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H.E.	Hematoxilina e Eosina
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
mRNA	RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVO.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
	3.1 Experimentos <i>in vitro</i> .....	23
	3.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO.....	23
	3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA.....	24
	3.1.3 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo.....	25
	3.2 Experimentos <i>in vivo</i> .....	26
	3.2.1 Procedimento cirúrgico para a criação do defeito em calvária de ratos.....	26
	3.2.2 Tratamento dos defeitos ósseos.....	27
	3.3 Análises microtomográfica e histológica.....	29
	3.3.1 Análise Microtomográfica ( $\mu$ CT).....	29
	3.3.2 Análise Histológica.....	30
	3.4 Análise Estatística.....	31
4	RESULTADOS.....	31
	4.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo ...	31
	4.2 Análise Morfométrica.....	32
	4.3 Avaliação da formação de tecido ósseo após a injeção de PBS e CTMs por análise histológica.....	36
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÕES.....	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44



## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem capacidade de reparação após uma lesão traumática, onde células osteoprogenitoras atuam em conjunto com citocinas, fatores de crescimento e células sanguíneas especializadas circundantes para promover a regeneração do defeito (GRAYSON *et al.*, 2015; KURODA *et al.*, 2014; RAGGATT *et al.*, 2014). No entanto, vários fatores podem prejudicar o reparo completo desse tecido, como aqueles associados à biologia (por exemplo, a vascularização deficiente), ao hospedeiro (por exemplo, doença vascular) e ao tratamento proposto (por exemplo, estabilização indevida) (KILLINGTON *et al.*, 2018).

Com o intuito de se obter a completa regeneração de defeitos ósseos, alguns tipos de enxertos são utilizados, dentre eles, os enxertos autógenos; para os quais o osso é colhido do próprio paciente, os aloenxertos; que são advindos de indivíduos da mesma espécie e os xenoenxertos; advindos de espécies diferentes (DAMIEN e PARSONS, 1991). Dentre essas opções, o enxerto autógeno é considerado o “padrão-ouro”, pois combina propriedades osteogênicas, osteoindutoras e ostocondutoras (LUTZ *et al.*, 2008; MYEROFF e ARCHDEACON, 2011; NKENKE e NEUKAM, 2014; PARK *et al.*, 2007). No entanto, seu uso em grandes defeitos é limitado devido à baixa quantidade de tecido disponível e a morbidade na área doadora (SHIBUYA e JUPITER, 2015).

Alternativamente, a medicina regenerativa tem avançado em pesquisas relacionadas ao campo da engenharia de tecidos e terapia celular. Em

engenharia de tecidos, combinam-se células, fatores de crescimento, citocinas e carreadores bioativos (scaffolds e/ou hidrogéis), buscando o aprimoramento das funções biológicas para regeneração do osso danificado (MARUYAMA *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2008; TEVLIN *et al.*, 2016). Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com diversos tipos de biomateriais, dentre eles carreadores naturais (esponja de gelatina), vítreos (Bio-sca) ou compósitos (PLGA/CaP) e a interação desses com células tronco mesenquimais (CTMs) e osteoblastos, atuando no reparo de defeitos em calvária de ratos (BELOTI *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2015; SICCHIERI *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que, independente do estado de diferenciação das CTMs, indiferenciadas ou diferenciadas em osteoblastos, essas células apresentam maior capacidade de formação óssea quando comparadas aos biomateriais isolados. Apesar de observamos formação óssea, não foi obtida a regeneração completa dos defeitos, possivelmente pela rápida degradação desses carreadores, de forma não previsível (como a esponja de gelatina) ou pela atração de células multinucleadas (como o PLGA/CaP) (BELOTI *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015). Dessa maneira, o tratamento utilizando apenas injeção de células, buscando o reparo completo de defeitos ósseos, torna-se uma alternativa promissora.

No campo da terapia celular, utilizam-se células autólogas ou alógenas com objetivo terapêutico de reparo, reconstrução ou suplementação de células danificadas (CHEN *et al.*, 2017). Dentre os tipos celulares empregados nessa terapia, as CTMs são as mais utilizadas porque elas podem migrar para sítios de lesão, e quando já alojadas, são capazes de recrutar células que contribuem

para a reparação dos tecidos, estimulam a atividade angiogênica e têm efeito anti-apoptótico (SHYAM *et al.*, 2017). Também podem ser utilizadas de forma alógena exercendo efeitos imunomodulatórios e imunossupressores (AMABLE *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2017; IKEGAME *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2004). Esse efeito não imunogênico e imunossupressor das CTMs, se deve à baixa expressão dos complexos de histocompatibilidade (MHC) de classe I e do MHC de classe II (JACOBS *et al.*, 2013; SALAMI *et al.*, 2018), além de inibirem a atividade e proliferação das células *natural killer*, linfócitos B, linfócitos T e a maturação de células dendríticas (BRUNO *et al.*, 2015; SALAMI *et al.*, 2018).

A despeito das várias tentativas de padronizar critérios para caracterizar CTMs não existe consenso na literatura, em parte porque CTMs engloba vários tipos celulares que não são uniformes e suas propriedades são influenciadas por características espécie específica, origem tecidual, método de obtenção, composição do meio de cultura e outros fatores. A *International Society for Cellular Therapy* definiu alguns critérios mínimos que, embora preconizados para células humanas, são amplamente aceitos, que são adesão ao poliestireno, expressão de antígenos de superfície, tais como CD73, CD90 e CD105, ausência de outros antígenos de superfície, como CD31, CD34, CD44 e CD45 e capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares, tais como osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI *et al.*, 2006). Nosso grupo de pesquisa tem utilizado CTMs obtidas de ratos e caracterizadas utilizando esses critérios (FREITAS *et al.*, 2017; FREITAS, 2019; FREITAS *et al.*, 2019a).

As primeiras CTMs que foram identificadas são aquelas presentes na medula óssea (CTMs-MO), que são também as mais frequentemente utilizadas em terapias regenerativas. No entanto, baixas concentrações de CTMs estão disponíveis na medula óssea e sua coleta requer técnicas invasivas (REN *et al.*, 2012). Nesse sentido, o tecido adiposo é considerado uma fonte abundante de CTMs (CTMs-TA), uma vez que apresentam elevado número de células, fácil remoção através de procedimento cirúrgico simples, como a lipoaspiração, apresentando risco moderado e menor desconforto para o paciente (BIANCO *et al.*, 2001; SCHÄFFLER e BÜCHLER, 2007; VIEIRA *et al.*, 2010).

Apesar das várias características comuns entre as CTMs-MO e CTMs-TA, alguns autores apontam diferenças entre essas fontes, sendo as CTMs-TA as de maior taxa proliferativa, menor índice de senescência (por serem geneticamente mais estáveis), permitindo assim, seu cultivo e manutenção em cultura por períodos mais longos. (CIUFFI *et al.*, 2017; HARASYMIAK-KRZYŻANOWSKA *et al.*, 2013; MIZUNO *et al.*, 2012; STRIOGA *et al.*, 2012). Tanto as CTMs-MO quanto as CTMs-TA se diferenciam em osteoblastos e adipócitos (ABUNA *et al.*, 2016; KERN *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2008; REBELATTO *et al.*, 2008). No entanto, alguns autores relatam que em culturas derivadas de medula óssea a diferenciação osteoblástica é favorecida enquanto naquelas de tecido adiposo há favorecimento da diferenciação adipocítica (ABUNA *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2008). Quando submetidas ao mesmo meio osteogênico, as CTMs-MO apresentam expressão de mRNA, marcadores de

proteínas ósseas e maior formação de matriz mineralizada do que as CTMs-TA (ABUNA *et al.*, 2016).

Buscando caracterizar as CTMs-MO e CTMs-TA, nosso grupo de pesquisa avaliou a expressão gênica em larga escala destas CTMs cultivadas sob as mesmas condições em termos de composição do meio de cultura, frequência de troca de meio, na temperatura de 37° C e sob atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Confirmando nossos resultados anteriores (ABUNA *et al.*, 2016), observou-se que as CTMs-TA apresentavam maior expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica, mas surpreendentemente também perfil mais angiogênico, enquanto as CTMs-MO demonstraram perfil mais osteogênico (FIDELES *et al.*, 2018), sendo esses resultados corroborados por outros trabalhos da literatura (AMABLE *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2017). Nas terapias de neovascularização, as CTMs-TA apresentaram melhores resultados consonante ao seu perfil mais pró-angiogênico comparadas às CTM-MO (AMABLE *et al.*, 2014; CHO *et al.*, 2017; IKEGAME *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2004). De modo geral, tanto as CTMs quanto os osteoblastos diferenciados a partir de CTMs-MO e CTMs-TA, apresentam maior expressão de genes relacionados com as etapas iniciais do processo da reparação tecidual (AMABLE *et al.*, 2014; FIDELES *et al.*, 2018; PERONI *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2005).

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para o uso de CTMs no tratamento de defeitos ósseos, como as injeções sistêmicas (intravascular) ou locais (HERNIGOU *et al.*, 2005; HORWITZ *et al.*, 2001, 1999; LE BLANC, 2005;

ORYAN *et al.*, 2017). A injeção intravascular de CTMs têm sido utilizada em estudos clínicos apresentando resultados promissores (HORWITZ *et al.*, 2001; LE BLANC *et al.*, 2005). Apesar dessa via de administração propiciar um aumento da formação óssea, ela apresenta efeitos negativos, como o aprisionamento dessas células nos pulmões e formação de microembolias vasculares (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2012; HORWITZ *et al.*, 1999). Quando se utiliza a técnica de injeções locais, maior quantidade de CTMs permanece na região do defeito ósseo, apresentando maior potencial osteogênico e imunomodulatório. Raynaud e Rafii (2013) observaram que injeções dessas células por via sistêmica são mais aconselháveis para o tratamento de fraturas múltiplas e profundas, enquanto que a injeção local de CTMs é mais adequada para defeitos ósseos únicos e superficiais.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com os princípios da terapia celular através de injeções locais na tentativa de reparar defeitos ósseos. Souza *et al.* (2018) e (2020) avaliaram o efeito da terapia celular com osteoblastos alogênicos injetados localmente no reparo de defeitos ósseos; os resultados demonstraram que injeção única de osteoblastos é capaz de induzir maior formação óssea. A terapia celular com CTMs-MO, CTMs-TA e osteoblastos derivados da medula óssea e do tecido adiposo foi efetiva, uma vez que essas células permaneceram no local da injeção e foi observada maior formação óssea nesses defeitos comparados àqueles que receberam somente PBS (FREITAS *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2019a; FREITAS *et al.*, 2019b). No entanto, não foi observado nesses estudos o reparo total dos defeitos ósseos

(FREITAS *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2019a; FREITAS *et al.*, 2019b; SOUZA *et al.*, 2018, SOUZA *et al.*, 2020), indicando a necessidade de se avaliar outras possibilidades de tratamento.

É interessante observar que tanto CTMs-MO quanto CTMs-TA, mesmo sendo relativamente distintas em termos de perfil de expressão gênica e potencial de diferenciação, induziram formação óssea bastante similares em relação aos parâmetros morfométricos, mas o tecido ósseo formado apresentou assinatura molecular distinta (FREITAS *et al.*, 2019a). Portanto, mesmo resultando na mesma formação óssea em termos quantitativos, é possível que CTMs-MO e CTMs-TA utilizem mecanismos, ao menos parcialmente, distintos que poderiam ser sinérgicos e aditivos. Neste sentido, existem evidências de que a combinação de diferentes tipos celulares contribuiria para o reparo de defeitos ósseos (GOODMAN e LIN, 2020). No entanto, a utilização de duas injeções distintas de CTMs-MO e CTMs-TA ou vice-versa, com a primeira injeção realizada duas semanas e a segunda injeção realizada 6 semanas após a criação dos defeitos, não resultou em aumento na formação de tecido ósseo (TÓTOLI, 2020). Portanto, a hipótese desse trabalho é que o uso combinado de CTMs-MO e CTMs-TA injetadas em defeitos ósseos em uma única administração pode favorecer o reparo do tecido ósseo.

## 2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da injeção local contendo a combinação de CTMs-MO e CTMs-TA na regeneração de defeitos ósseos criados em calvária de ratos.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sob número de protocolo 2019.1.577.58.8, que consta no anexo A.

### 3.1 Experimentos in vitro

Os experimentos *in vitro* foram realizados como descrito anteriormente por Freitas *et al.*(2020).

#### 3.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO

Vinte e cinco ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, provenientes do Biotério Central do Campus Ribeirão Preto/USP, pesando entre 150 e 200g foram eutanasiados com dose excessiva de isoflurano 2% (Cristal Pharma, Brasil) de uso inalatório. As células foram obtidas como descrito previamente



(FREITAS et al., 2020). Brevemente, após remoção cirúrgica, os fêmures foram levados ao fluxo laminar em solução de meio essencial mínimo modificação alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) contendo 0,5 mg/ml de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,72 mg/ml de anfotericina b (Gibco-Life Technologies). Após antissepsia, remoção dos tecidos moles remanescentes e das epífises, a medula óssea foi coletada por irrigação com meio de crescimento [ $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50  $\mu$ g/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco-Life Technologies) e 500  $\mu$ g/mL de anfotericina B (Gibco-Life Technologies)]. Essas células foram cultivadas nesse meio em garrafas de cultura de 175 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, EUA) por 10 dias para permitir a expansão e seleção das CTMs-MO por aderência ao poliestireno. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 h.

### 3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA

Para obtenção das CTMs-TA foi utilizado o tecido adiposo da região inguinal dos mesmos ratos utilizados para obtenção de medula óssea, de acordo com método descrito previamente (FREITAS et al., 2020). No fluxo laminar, após lavagem com tampão fosfato-salino (PBS- Invitrogen), o tecido adiposo foi fragmentado para ser enzimaticamente digerido em solução de colagenase II 0,075% (Gibco-Life Technologies) com agitação constante por 40 minutos em

banho maria a 37°C. Em seguida, a ação enzimática da colagenase foi neutralizada pela adição de meio de crescimento e esta solução centrifugada a 600g por 5 minutos, após o que o sobrenadante foi descartado. O precipitado do fundo do tubo foi ressuspendido em meio de crescimento e as células, cultivadas nesse meio em garradas de cultura de 175 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, EUA) por 10 dias, o que permitiu a seleção e expansão das CTMs-TA.

### 3.1.3 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo

Após 10 dias de cultivo, CTMs-MO e CTMs-TA foram descoladas com uso da solução de tripsina/EDTA (95% de tripsina [Gibco-Life Technologies] e 5% de EDTA [Gibco-Life Technologies]). Após centrifugações, as células foram ressuspendidas e sua concentração ajustada para  $5 \times 10^5$  células por tubo para serem incubadas, em separado, com os seguintes anticorpos primários: anti-CD29, -CD31, -CD34, -CD44, -CD45, -CD90 e -CD106 (B&D Biosystems, EUA). Para as incubações, as células foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos, após os quais, elas foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (Invitrogen-Life Technologies) /Tween-20 (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugadas a 600 g por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, as células foram lavadas com PBS (Invitrogen-Life Technologies) e adicionados 500 µL de solução de formaldeído (Merck, Alemanha) diluído a 1% em PBS (Invitrogen-Life Technologies). As células foram estocadas ao abrigo da luz a 8°C até a análise no citômetro de fluxo FACSCanto™ (B&D Biosystems).

### 3.2 Experimentos *in vivo*

Todos os experimentos *in vivo* foram realizados como descrito anteriormente (FREITAS *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2019a; FREITAS *et al.*, 2019b; SOUZA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020).

#### 3.2.1 Procedimento cirúrgico para a criação do defeito em calvária de ratos

Ratos machos da linhagem Sprague-Dawley pesando aproximadamente 150 a 200g, provenientes do Biotério Central do Campus Ribeirão Preto/USP, foram utilizados para a criação dos defeitos em calvária. Os animais foram anestesiados com solução de anestésico geral contendo cetamina (Agener União, Brasil) na dosagem de 75 mg/kg de peso corporal e xilazina na dosagem de 6 mg/kg de peso corporal (Hertape Calier Saúde Animal S/A, Brasil) por via intramuscular. Para controle da dor foi realizada injeção subcutânea de flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil).

As calvárias foram submetidas à tricotomia e antissepsia com solução de povidina-iodo alcoólica. Em seguida, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados seguindo a sutura sagital para permitir o acesso cirúrgico aos ossos parietais. Após destacar o perióstio, foi criado no lado esquerdo um defeito ósseo com 5 mm de diâmetro utilizando uma broca trefina (Neodent, Brasil) com irrigação abundante com soro fisiológico para prevenir danos ao tecido ósseo

remanescente. Ao final do procedimento, a pele foi reposicionada e a ferida cirúrgica fechada por sutura com fio de seda 4.0 (Ethicon Ltda, Brasil). Para permitir a localização dos defeitos nos períodos pós-operatórios e realizar-se as injeções de células, seus limites determinados por palpação e delimitados na pele com marcadores permanentes (Sharpie, Sharpieville, EUA). Para controle da dor pós-operatória, os animais receberam dose única de flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough), e para prevenir infecções, solução de antibióticos contendo benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Durante todo o experimento, os animais foram alocados em caixas (3 ratos/caixa) com livre acesso a ração e água.

### 3.2.2 Tratamento dos defeitos ósseos

Duas semanas após a criação dos defeitos, os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (G1-G6) experimentais contendo 13 animais cada, que receberam injeções locais nos defeitos de calvária como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Grupos de tratamento com injeções locais de células, CTMs-MO, CTMs-TA, em defeitos de calvária de ratos. Os defeitos receberam injeção de  $5 \times 10^6$  células/ 50  $\mu$ L de PBS.

GRUPOS	TRATAMENTO
G1	PBS
G2	50% CTMs-MO/50% CTMs-TA
G3	25% CTMs-MO/75% CTMs-TA
G4	75% CTMs-MO/25% CTMs-TA
G5	100% CTMs-MO
G6	100% CTMs-TA

Todas as injeções foram realizadas com agulha 21G, que possibilita a passagem das CTMs sem alterar sua viabilidade (FREITAS *et al.*, 2019a), inserida subperiostealmente tangenciando a calota craniana com o bisel voltado para posição ventral e com a extremidade da agulha próxima ao centro do defeito.

A eutanásia desses animais foi realizada 10 semanas após a criação dos defeitos ósseos (8 semanas após as injeções), com dose excessiva de tiopental sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) na dosagem de 100-120 mg/Kg associado à lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Brasil) na dosagem de 1 mg/Kg, via intramuscular. Após a eutanásia, os animais foram decapitados usando uma guilhotina, e as cabeças foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (pH=7) por 48h. Em seguida, as peças foram reduzidas para blocos

compreendendo a área do defeito cirúrgico original e dos tecidos circunjacentes para as análises microtomográfica e histológica.

### 3.3 Análises microtomográfica e histológica

#### 3.3.1 Análise Microtomográfica ( $\mu$ CT)

As calvárias fixadas foram transferidas para uma solução de etanol 70% por 3 dias. A análise microtomográfica foi realizada no microtomógrafo SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1  $\mu$ m.

Inicialmente, foi delimitado o volume de interesse para incluir as bordas e os limites do defeito ósseo com 5 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Para obtenção dos dados foi utilizado o software de aquisição de imagens bidimensionais do próprio microtomógrafo e para as análises, foram feitas as reconstruções tridimensionais (3D) utilizando-se o software NRecon. Em seguida, foram analisados, na região dos defeitos ósseos, os parâmetros preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (PARFITT *et al.*, 1987), automaticamente gerados pelo software, que são: volume ósseo ( $\text{mm}^3$ ), volume ósseo/volume total (%), superfície óssea ( $\text{mm}^2$ ), espessura trabecular (mm), número trabecular (1/mm), separação trabecular (mm) e a densidade mineral óssea ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ).

### 3.3.2 Análise Histológica

Após o escaneamento e análise em  $\mu$ CT, as amostras foram submetidas ao processamento histotécnico. As amostras foram lavadas por 48 horas em água corrente e mantidas em EDTA 10% sob agitação, realizando-se 2 trocas semanais. Passadas 3 semanas e após a confirmação da desmineralização por perfuração com agulha, estas foram submetidas às demais etapas do processamento histológico. A desidratação das peças foi feita pelo uso crescente de solução de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). As peças foram então incluídas em parafina, pelo auxílio de uma inclusora Histo Embedder (Leica Reichert & Jung Products - Heildelberg, Alemanha).

Os cortes histológicos longitudinais foram confeccionados com 5  $\mu$ m de espessura iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original e montados em lâminas de vidro. Posteriormente, foi realizado a desparafinização dos cortes utilizando xilol, hidratados em série decrescente de etanol, ficando 5 minutos em cada concentração. Iniciando com etanol a 100%, repetindo por duas vezes, seguido por concentrações 95%, 90%, 80%, 70% e finalizando com 50%. Para as análises foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.).

Para análise histológica foi utilizado um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (Axiocam ICc3, Carl Zeiss).

### 3.4 Análise Estatística

Os dados numéricos obtidos foram tabulados para realização da análise descritiva e para o teste estatístico adequado foi determinado pelo teste de aderência à curva normal Shapiro-Wilk. Os dados foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Systat Software). Para todas as comparações foi adotado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA por citometria de fluxo

As culturas de CTMs-MO e CTMs-TA expressaram marcadores de superfície característicos de CTMs como comprovado pela citometria de fluxo. Ambas as culturas se caracterizaram pela alta expressão dos marcadores de superfície CD29 e CD90, e baixa expressão dos marcadores CD31, CD34, CD44, CD45 e CD106. Dados mostrados na Tabela 2.



**Tabela 2.** Valores em porcentagem (%) e mediana de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) expressando marcadores de superfície.

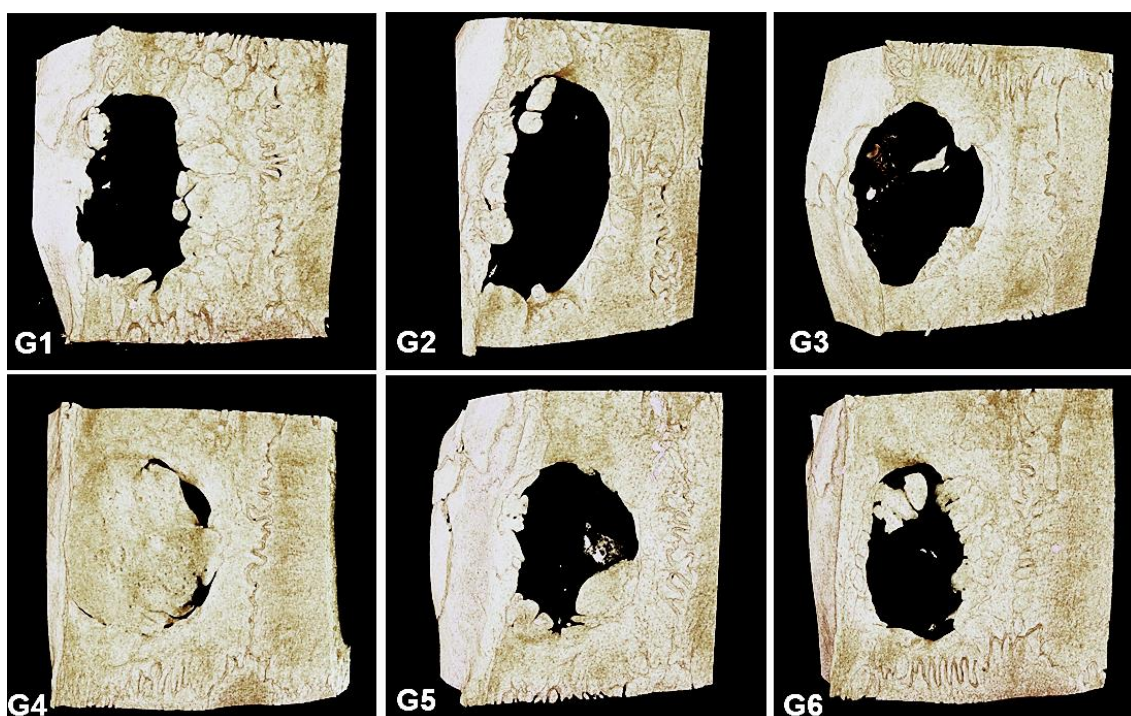
MARCADORES DE SUPERFÍCIE	CTMs-MO		CTMs-TA	
	%	Mediana	%	Mediana
<b>CD 29</b>	99,9	16,8	100	63,0
<b>CD 90</b>	92,2	90,8	99,9	13,4
<b>CD 31</b>	2,2	2,8	1,3	8,2
<b>CD 34</b>	11,0	6,1	1,4	1,1
<b>CD 44</b>	37,3	1,6	0,6	8,0
<b>CD 45</b>	42,0	14,7	7,5	5,9
<b>CD 106</b>	32,4	1,1	45,9	7,0

Todos os grupos inicialmente tinham 13 animais, entretanto, por várias razões nem todos os ratos foram utilizados resultando em 10 animais no G1, 13 animais no G2, 10 animais no G3, 13 animais no G4, 10 animais no grupo G5 e 11 animais no G6.

#### 4.2 Análise Morfométrica

As reconstruções tridimensionais (3D) evidenciam formação óssea em todos os defeitos independentemente do tratamento. No entanto, observa-se maior formação nos animais tratados com injeções locais contendo 75% CTMs-

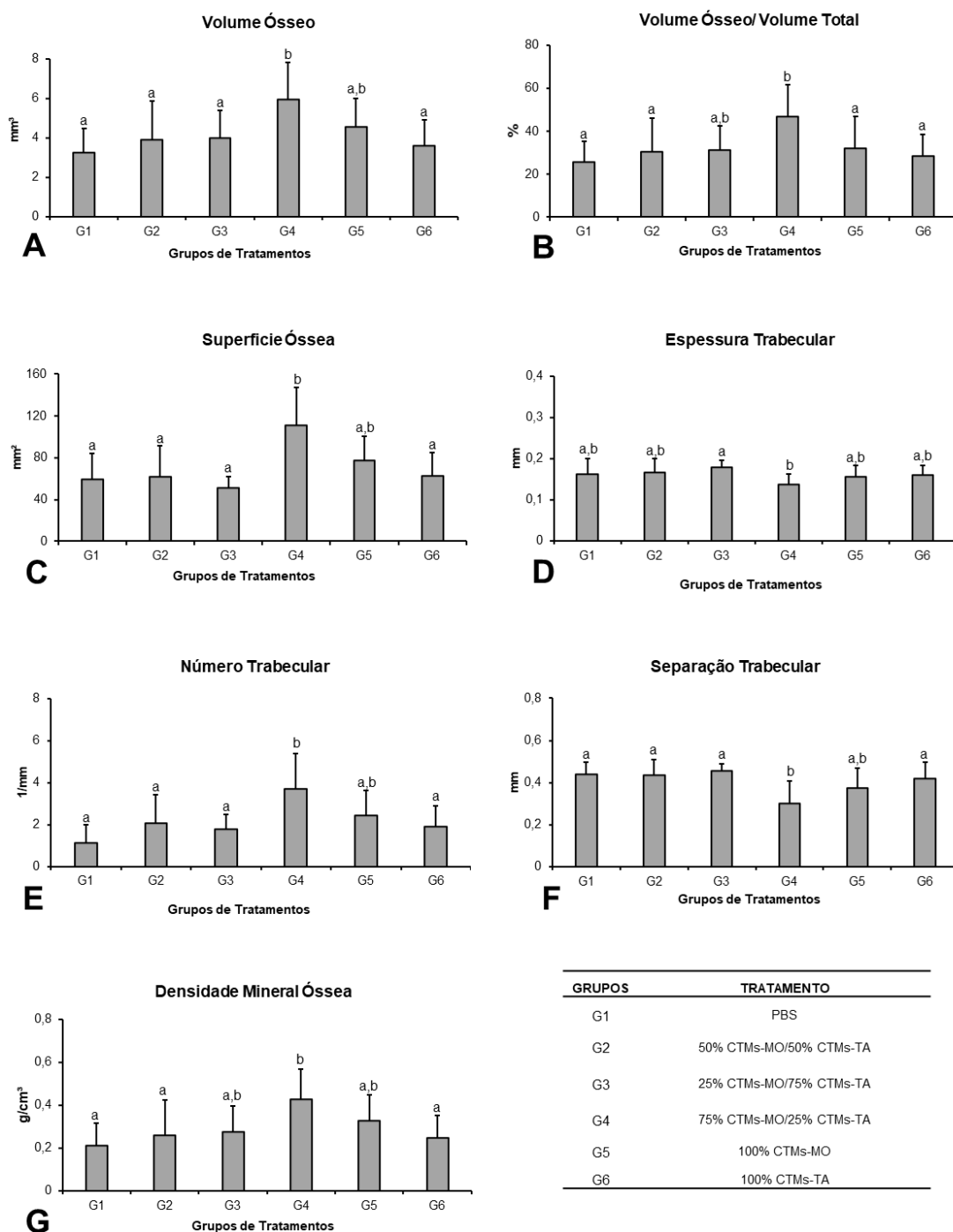
MO/25% CTMs-TA. Interessante é que se observa formação óssea somente nas bordas dos defeitos nos ratos tratados com injeções locais de PBS, mas a formação óssea nos defeitos tratados com injeções de células pode ser observada em áreas mais centrais e não relacionadas às bordas (Fig. 1).



**Figura 1.** Reconstruções microtomográficas em 3D dos defeitos ósseos criados em calvária de ratos, tratados com injeções locais de PBS sem células (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) ao final de 8 semanas.

Os resultados da análise morfométrica corroboram as observações das reconstruções 3D. Houveram diferenças entre os grupos de tratamento estatisticamente significantes para todos os parâmetros avaliados: volume ósseo ( $p=0,002$ ) (Fig. 2A), volume ósseo/volume total ( $p=0,003$ ) (Fig. 2B), superfície

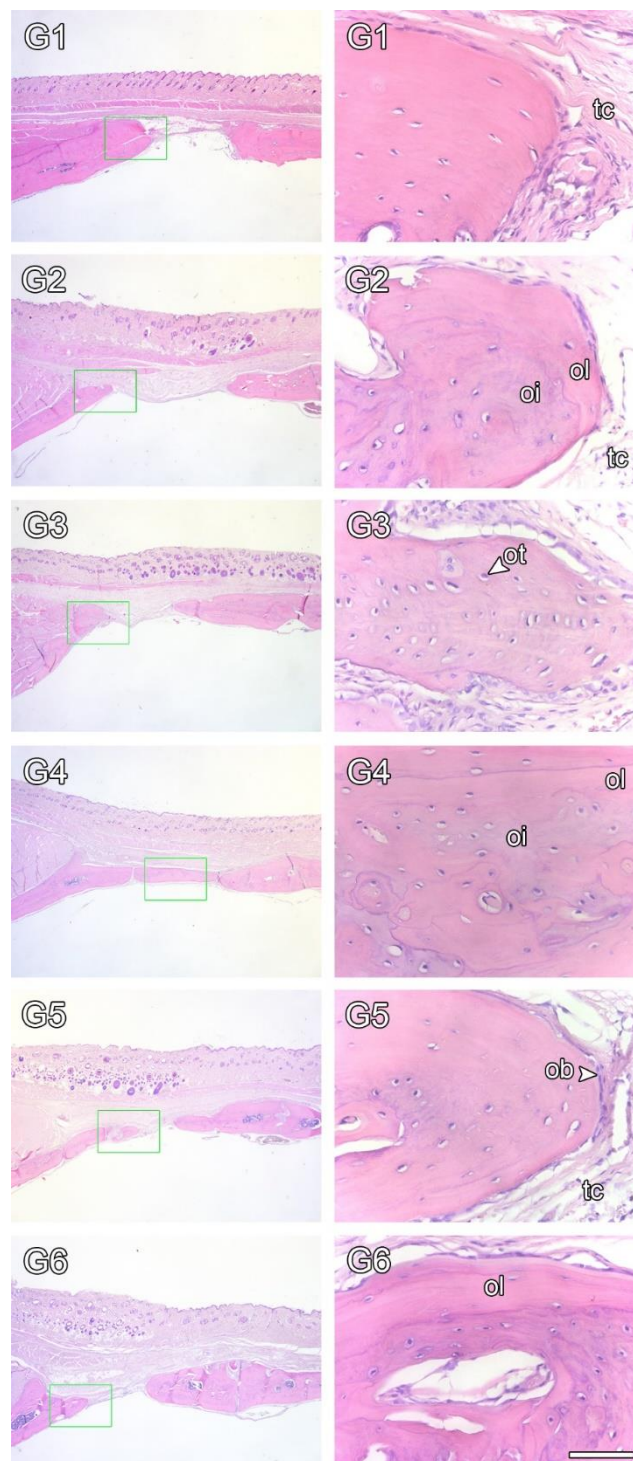
óssea ( $p=0,001$ ) (Fig. 2C), espessura trabecular ( $p=0,018$ ) (Fig. 2D), número trabecular ( $p=0,001$ ) (Fig. 2E), separação trabecular ( $p=0,001$ ) (Fig. 2F) e a densidade mineral óssea ( $p=0,002$ ) (Fig. 2G). Todos os dados obtidos para os parâmetros morfométricos são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão na Figura 2. O tratamento com a combinação de 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4) resultou em maior formação óssea, como evidenciado pelos parâmetros volume ósseo, volume ósseo/volume total, superfície óssea, número trabecular, separação trabecular e densidade mineral óssea.



**Figura 2.** Parâmetros morfométricos da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeções locais de PBS sem células (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) em 8 semanas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes.

#### 4.3 Avaliação da formação de tecido ósseo após a injeção de PBS e CTMs por análise histológica.

A análise histológica dos cortes descalcificados mostra ausência de sinais inflamatórios em todos os grupos (Fig. 3). Confirmando os resultados encontrados nas análises morfométricas, os grupos G1, G2, G3, G5 e G6, apresentaram pouca formação óssea e, principalmente, limitada às margens dos defeitos. Nos tratamentos com 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA o tecido ósseo formado preencheu quase toda a extensão dos defeitos. Independentemente do tratamento, em geral, o tecido ósseo formado relevou características morfológicas de osso lamelar com presença de canais de Havers e em outras regiões osso imaturo ainda não organizado em lamelas, ambos com osteócitos e osteoblastos.



**Figura 3.** Fotomicrografia por microscopia de luz de defeitos da calvária de ratos tratados com uma injeção local de PBS (G1), combinação de 50% CTMs-MO/50% CTMs-TA (G2), 25% CTMs-MO/75% CTMs-TA (G3), 75% CTMs-MO/25% CTMs-TA (G4), 100% CTMs-MO (G5) e 100% CTMs-TA (G6) em 8 semanas. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). tc: tecido conjuntivo; ob:osteoblasto; ot: osteócito; oi= osso imatura; ol=osso lamelar. Barra de escala: esquerda=1,25 mm; direita= 100  $\mu$ m.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi testada a hipótese de que a combinação de CTMs-MO com CTMs-TA aumenta a formação óssea em defeitos de calvária de ratos. Para tanto, diferentes combinações de CTMs-MO/CTMs-TA foram avaliadas e comparadas com CTMs-MO e CTMs-TA utilizadas sozinhas, tendo como controle negativo injeção de PBS, o veículo para a injeção das células. Primeiro, as CTMs utilizadas foram obtidas e cultivadas como preconizado por Freitas *et al.* (2020) e, neste estudo, caracterizadas por imunofenotipagem. Em seguida, as CTMs foram injetadas em defeitos de 5mm de diâmetro criados em calvária de ratos duas semanas após a criação dos defeitos, mimetizando o tratamento de defeitos ósseos pré-existentes (FREITAS, 2019; FREITAS *et al.*, 2019a). A combinação de 75% de CTMs-MO com 25% de CTMs-TA resultou na maior formação óssea quando comparada às outras combinações de CTMs ou às CTMs injetadas isoladamente.

A *International Society for Cellular Therapy* preconiza que as CTMs humanas devam ser caracterizadas por alta porcentagem de células expressando alguns marcadores de superfície, tais como, CD29 e CD90, e baixa porcentagem expressando CD31 e CD34 dentre outros. Adicionalmente, as CTMs devem ser capazes de diferenciação em várias linhagens celulares, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI *et al.*, 2006). Por analogia, esses parâmetros têm sido utilizados para caracterizar CTMs de outras espécies, incluindo ratos. Como neste estudo as CTMs foram obtidas e cultivadas de

acordo com o protocolo descrito por Freitas *et al.* (2020), no qual foi demonstrado que ambas CTMs-MO e CTMs-TA são capazes de diferenciação multilinhagens, somente a expressão dos marcadores de superfície foi utilizada para caracterizar as CTMs. Realmente, ambas culturas mostraram perfil imunofenotípico característico de CTMs, ou seja, alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem expressando CD31 e CD34. As CTMs-MO apresentaram expressão de CD44 e CD45, que estava praticamente ausente nas CTMs-TA e ambas apresentaram expressão de CD106. A maior expressão de CD31 e CD34, que são mais conhecidos como marcadores hematopoiéticos, em culturas de CTMs-MO pode ser devido às mesmas serem originadas da medula óssea que é predominantemente hematopoiética, o que não ocorre com o tecido adiposo (HAN *et al.*, 2010).

O uso de combinações de células para aumentar a formação óssea tem sido relatado na literatura, principalmente, focando na cotransplantação de células endoteliais com CTMs carregadas em arcabouços, o que resulta em aumento da vascularização e formação óssea (SEEBACH *et al.*, 2012; ZIGDON-GILADI *et al.*, 2015). A hipótese de que a combinação de CTMs-MO com osteoblastos diferenciados de CTMs-MO poderia aumentar a formação óssea porque ambas contribuiriam de forma sinérgica para a osteogênese (BELOTI *et al.*, 2012) não foi confirmada quando estas células foram combinadas com arcabouços de esponja de gelatina (SANTOS *et al.*, 2015). Provavelmente, ao menos em parte, devido à repressão da diferenciação osteoblástica induzidas pelas CTMs-MO (SANTOS *et al.*, 2015). Por outro lado, os resultados deste



estudo mostrando que a combinação de CTMs-MO com CTMs-TA, embora somente observada com a proporção de 75%/25%, foi efetiva em aumentar a formação óssea em defeitos de calvária de ratos, comprovam a nossa hipótese. Dos sete parâmetros morfométricos avaliados por  $\mu$ CT, em seis deles a combinação 75%CTMs-MO/25%CTMs-TA resultou em maior formação óssea e somente para a espessura trabecular este tratamento apresentou redução em comparação com outros tratamentos. A avaliação histológica dos defeitos ósseos comprova os achados morfométricos ao mostrar que, somente para o tratamento com 75%CTMs-MO/25%CTMs-TA foi observada a quase completa regeneração dos defeitos. Corroborando com esses dados, a densidade mineral do osso formado por este tratamento,  $0,429 \text{ g/cm}^3$ , é praticamente idêntica à do osso da calota removido para a criação do defeito,  $0,423 \text{ g/cm}^3$ , conforme determinado por Freitas *et al.* (2021). Todos os outros tratamentos, embora sem significância estatística, mostraram tendência em aumentar a formação óssea comparados com o controle, injeção de PBS sem células. Isto é corroborado pela observação de que nos defeitos tratados com células houve formação óssea nas áreas mais centrais enquanto nos defeitos que não receberam células, a formação óssea somente ocorreu nas bordas.

Avaliar o efeito das combinações de CTMs-MO com CTMs-TA foi fundamentada em observações prévias que mostraram que ambas são igualmente eficazes em induzir formação óssea (FREITAS *et al.*, 2019a), mas devido a diferenças relevantes entre elas evidenciadas, por exemplo, em seus processos de diferenciação osteoblástica e adipocítica (ABUNA *et al.*, 2016;

BRENNAN *et al.*, 2017), é provável que ambas exerçam seus efeitos por mecanismos distintos. Esta hipótese também é sustentada pelo fato de que as CTMs-TA apresentam perfil de expressão gênica angiogênica e favorecem a angiogênese em comparação com as CTMs-MO (AMABLE *et al.*, 2014; BRENNAN *et al.*, 2017; CHO *et al.*, 2017; FIDELES *et al.*, 2019). Os experimentos realizados neste estudo não permitem sugerir os mecanismos pelos quais a combinação de 75%CTMs-MO/25%CTMs-TA resultou em aumento da formação óssea. No entanto, como existe consenso de que o efeito terapêutico mais importante que as células utilizadas na terapia celular exerce é por meio da sua ação parácrina sobre as células que participam da regeneração (BALDARI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2014; GOODMAN e LIN, 2020; PROCKOP, 2009), é provável que isto tenha contribuído para os resultados encontrados. Para confirmar ou não essa possibilidade, será necessário realizar experimentos *in vitro* avaliando diversos parâmetros de coculturas de CTMs-MO e CTMs-TA. Dentre esses efeitos, pode-se descartar a ação sobre células endoteliais porque tanto CTMs-MO como CTMs-TA são igualmente eficazes em modular as células responsáveis pela formação de vasos sanguíneos (LIN *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante nos experimentos para avaliar a formação óssea para o qual esse estudo traz contribuição relevante, é o período de avaliação dos efeitos da terapia celular. Ao realizar análise da expressão gênica no tecido formado em defeitos de calvária de ratos pela injeção de CTMs, Freitas *et al.* (2019a) mostraram que decorridas 4 semanas da injeção o tecido ósseo induzido pelas CTMs-MO apresentava perfil gênico mais compatível com predominância

de formação óssea. Isto é, o processo de formação óssea, aparentemente, não estava completo, portanto, avaliações em períodos mais longos poderiam mostrar aumento do tecido ósseo formado. A partir disso, neste estudo optamos por avaliar o tecido ósseo ao final de 8 semanas da injeção de células. No entanto, ao compararmos o principal parâmetro morfométrico, % volume ósseo, que significa a porcentagem de osso encontrado no volume total do defeito, Freitas *et al.* (2019a) encontraram 45,07% após 4 semanas e aqui 46,94% após 8 semanas. Ainda, utilizando-se a razão entre %volume ósseo nos defeitos que receberam células pelo %volume ósseo dos defeitos controle (FREITAS *et al.*, 2021) mostra que após 4 semanas a razão é 1,79 (FREITAS *et al.*, 2019a) e após 8 semanas é 1,72. Isto mostra que não há diferença relevante em avaliar a formação óssea em 8 semanas e sugere que ao final de 4 semanas o processo está completo, o que não significa aumento na regeneração óssea.

Os resultados deste estudo abrem novas perspectivas na terapia celular baseada em CTMs ao mostrar que uma combinação específica de CTMs-MO com CTMs-TA induziu maior formação óssea do que outras combinações possíveis de ambas as CTMs, ou ainda mais relevante, do que essas CTMs isoladamente. Desvendar os mecanismos pelos quais esses efeitos foram potenciados demandam novas abordagens experimentais.

## 6 CONCLUSÕES

Baseando se nos resultados obtidos pode se concluir:

- As células derivadas da medula óssea e do tecido adiposo foram caracterizadas como CTMs, e
- A terapia celular com 75%CTMs-TA/25%CTMs-MO, foi mais efetiva para aumentar a formação óssea nos defeitos de calvária de ratos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNA, R. P. F.; OLIVEIRA, F. S. D.; SANTOS, T. D. S.; GUERRA, T. R.; ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Participation of TNF- $\alpha$  in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 1, p. 204–214, 2016.

AMABLE, P. R.; TEIXEIRA, M. V. T.; CARIAS, R. B. V.; GRANJEIRO, J. M.; BOROJEVIC, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 2, p. 53, 2014.

BALDARI, S.; DI ROCCO, G.; PICCOLI, M.; POZZOBON, M.; MURACA, M.; TOIETTA, G. Challenges and strategies for improving the regenerative effects of mesenchymal stromal cell-based therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2087, 2017.

BELOTI, M. M.; SICCHIERI, L. G.; DE OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. **Tissue Engineering**, v. 18, n. 9, p. 999–1005, 2012.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180–192, 2001.

BRENNAN, M. A.; RENAUD, A.; GUILLOTON, F.; MEBARKI, M.; TRICHET, V.; SENSEBÉ, L.; DESCHASEAUX, F.; CHEVALLIER, N.; LAYROLLE, P. Inferior in vivo osteogenesis and superior angiogenesis of human adipose-derived stem cells compared with bone marrow-derived stem cells cultured in xeno-free conditions. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 12, p. 2160–2172, 2017.

BRUNO, S.; DEREGIBUS, M. C.; CAMUSSI, G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, p. 154–158, 2015.

CASTELO-BRANCO, M. T. L.; SOARES, I. D. P.; LOPES, D. V.; BUONGUSTO, F.; MARTINUSSO, C. A.; DO ROSARIO, A.; SOUZA, S. A. L.; GUTFILEN, B.; FONSECA, L. M. B.; ELIA, C.; MADI, K.; SCHANAIDER, A.; ROSSI, M. I. D.; SOUZA, H. S. P. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012.

CHEN, J.; ZHENG, S.; HUANG, H.; HUANG, S.; ZHOU, C.; HOU, J.; JIANG, J.; WANG, J.; WU, W.; WANG, T. Mesenchymal stem cells enhanced cardiac nerve sprouting via nerve growth factor in a rat model of myocardial infarction. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 12, p. 2023–2029, 2014.

CHEN, Y.C.; CHENG, H.F.; YEH, M.K. Cell therapy regulation in Taiwan. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 3, p. 483–492, 2017.

CHO, K.A.; PARK, M.; KIM, Y.H.; WOO, S.Y.; RYU, K.H. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

CIUFFI, S.; ZONEFRATI, R.; BRANDI, M. L. Adipose stem cells for bone tissue repair. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 217–226, 2017.

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

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. 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.

FERRAZ, E. P.; FREITAS, G. P.; CROVACE, M. C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; DE OLIVEIRA, P. T.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (BioS-2P) for bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 4, p. 045018, 2017.

FIDELES, S. O. M.; ORTIZ, A. C.; ASSIS, A. F.; DUARTE, M. J.; OLIVEIRA, F. S.; PASSOS, G. A.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 11842-11852, 2019.

FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; ALMEIDA, A. L. G.; ABUNA, R. P. F.; GIMENES, R.; SOUZA, L. E. B.; COVAS, D. T.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. **Calcified Tissue International**, v. 101, n. 3, p. 312–320, 2017.

FREITAS, G. P. **Efeito de injeções locais de células-tronco mesenquimais ou osteoblastos na regeneração do tecido ósseo**. 2019. 131f. Tese (Doutorado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial), Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; SOUZA, A. T. P.; OLIVEIRA, P. G. F. P.; ALMEIDA, A. L. G.; SOUZA, L. E. B.; COELHO, P. G.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Cell therapy: effect of locally injected mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvarial defects. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019a.

FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; P SOUZA, A. T.; F P OLIVEIRA, P. G.; G ALMEIDA, A. L.; COELHO, P. G.; FERREIRA, F. U.; COVAS, D. T.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone

marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. **Regenerative Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1107–1119, 2019b.

FREITAS, G. P., SOUZA, A. T., LOPES, H. B., TREVISAN, R. L., OLIVEIRA, F. S., FERNANDES, R. R., FERREIRA, F. U., ROS, F. A., BELOTI, M. M., ROSA, A. L. Mesenchymal stromal cells derived from bone marrow and adipose tissue: Isolation, culture, characterization and differentiation. **Bio-protocol**, v. 10, n. 4, p. e3534, 2020.

FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; SOUZA, A. T. P.; GOMES, M. P. O.; QUILES, G. K.; GORDON, J.; TYE, C.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 by CRISPR-Cas9 present high in vitro osteogenic potential and enhance in vivo bone formation. **Gene Therapy**, p. 1–12, 2021.

GOODMAN, S. B.; LIN, T. Modifying msc phenotype to facilitate bone healing: biological approaches. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

GRAYSON, W. L.; BUNNELL, B. A.; MARTIN, E.; FRAZIER, T.; HUNG, B. P.; GIMBLE, J. M. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. **Nature Reviews: Endocrinology**, v. 11, n. 3, p. 140–150, 2015.

HAN, Y.; KUANG, S.-Z.; GOMER, A.; RAMIREZ-BERGERON, D. L. Hypoxia influences the vascular expansion and differentiation of embryonic stem cell cultures through the temporal expression of vascular endothelial growth factor receptors in an ARNT-dependent manner. **Stem Cells**, v. 28, n. 4, p. 799–809, 2010.

HARASYMIAK-KRZYŻANOWSKA, I.; NIEDOJADŁO, A.; KARWAT, J.; KOTUŁA, L.; GIL-KULIK, P.; SAWIUK, M.; KOCKI, J. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 18, n. 4, p. 479–493, 2013



HERNIGOU, P.; POIGNARD, A.; BEAUJEAN, F.; ROUARD, H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 87, n. 7, p. 1430–1437, 2005.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; FITZPATRICK, L. A.; KOO, W. W.; GORDON, P. L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J. C.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v. 5, n. 3, p. 309–313, 1999.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J.; GORDON, P. L.; KOO, W. W.; FITZPATRICK, L. A.; NEEL, M. D.; MCCARVILLE, M. E.; ORCHARD, P. J.; PYERITZ, R. E.; BRENNER, M. K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. **Blood**, v. 97, n. 5, p. 1227–1231, 2001.

IKEGAME, Y.; YAMASHITA, K.; HAYASHI, S.-I.; MIZUNO, H.; TAWADA, M.; YOU, F.; YAMADA, K.; TANAKA, Y.; EGASHIRA, Y.; NAKASHIMA, S.; YOSHIMURA, S.-I.; IWAMA, T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. **Cytotherapy**, v. 13, n. 6, p. 675–685, 2011.

JACOBS, S. A.; ROOBROUCK, V. D.; VERFAILLIE, C. M.; VAN GOOL, S. W. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 32–39, 2013.

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

KILLINGTON, K.; MAFI, R.; MAFI, P.; KHAN, W. S. A systematic review of clinical studies investigating mesenchymal stem cells for fracture non-union and bone defects. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 4, p. 284–291, 2018.

KURODA, R.; MATSUMOTO, T.; KAWAKAMI, Y.; FUKUI, T.; MIFUNE, Y.; KUROSAKA, M. Clinical impact of circulating cd34-positive cells on bone regeneration and healing. **Tissue Engineering**, v. 20, n. 3, p. 190–199, 2014.

LE BLANC, K. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**, v. 79, n. 11, p. 1607–1614, 2005.

LIN, R.-Z.; MORENO-LUNA, R.; ZHOU, B.; PU, W. T.; MELERO-MARTIN, J. M. Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. **Angiogenesis**, v. 15, n. 3, p. 443–455, 2012.

LUTZ, R.; PARK, J.; FELSZEGHY, E.; WILTFANG, J.; NKENKE, E.; SCHLEGEL, K. A. Bone regeneration after topical BMP-2-gene delivery in circumferential peri-implant bone defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 6, p. 590–599, 2008.

MARUYAMA, T.; JEONG, J.; SHEU, T.-J.; HSU, W. Stem cells of the suture mesenchyme in craniofacial bone development, repair and regeneration. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A. C. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem Cells**, v. 30, n. 5, p. 804–810, 2012.

MYEROFF, C.; ARCHDEACON, M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 93, n. 23, p. 2227–2236, 2011.

NKENKE, E.; NEUKAM, F. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. **Eur J Oral Implantol**, v. 7, n. Suppl2, p. 203–217, 2014.

ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRI, A.; BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: what is the evidence? **Cells, Tissues, Organs**, v. 204, n. 2, p. 59–83, 2017.

PARK, J.; LUTZ, R.; FELSZEGHY, E.; WILTFANG, J.; NKENKE, E.; NEUKAM, F. W.; SCHLEGEL, K. A. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. **Biomaterials**, v. 28, n. 17, p. 2772–2782, 2007.

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 and Development**, v. 17, n. 4, p. 761–774, 2008.

PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIÈ, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 3, p. 603–615, 2008.

PROCKOP, D. J. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (mscs): controversies, myths, and changing paradigms. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 6, p. 939–946, 2009.

RAGGATT, L. J.; WULLSCHLEGER, M. E.; ALEXANDER, K. A.; WU, A. C. K.; MILLARD, S. M.; KAUR, S.; MAUGHAM, M. L.; GREGORY, L. S.; STECK, R.; PETTIT, A. R. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 12, p. 3192–3204, 2014.

RAYNAUD, C. M.; RAFII, A. The necessity of a systematic approach for the use of mscs in the clinical setting. **Stem Cells International**, 2013.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, 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. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901–913, 2008.

REN, Y.; WU, H.; ZHOU, X.; WEN, J.; JIN, M.; CANG, M.; GUO, X.; WANG, Q.; LIU, D.; MA, Y. Isolation, expansion, and differentiation of goat adipose-derived stem cells. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 404–411, 2012.

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 Review of Medical Devices**, v. 5, n. 6, p. 719–728, 2008.

SALAMI, F.; TAVASSOLI, A.; MEHRZAD, J.; PARHAM, A. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils. **Immunobiology**, v. 223, n. 12, p. 786–791, 2018.

SANTOS, T. de S.; ABUNA, R. P. F.; LOPES, H. B.; DE ALMEIDA, A. L. G.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. **Regenerative Medicine**, v. 10, n. 2, p. 127–133, 2015.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 818–827, 2007.

SEEBACH, C.; HENRICH, D.; WILHELM, K.; BARKER, J. H.; MARZI, I. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 8, p. 1667–1677, 2012.

SHIBUYA, N.; JUPITER, D. C. Bone graft substitute: allograft and xenograft. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 21–34, 2015.

SHYAM, H.; SINGH, S. K.; KANT, R.; SAXENA, S. K. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: a new paradigm for degenerative bone diseases. **Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 111–114, 2017.

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

SOUZA, A. T. P.; FREITAS, G. P.; LOPES, H. B.; FERRAZ, E. P.; OLIVEIRA, F. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. **Cytotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1267–1277, 2018.

SOUZA, A. T. P.; LOPES, H. B.; FREITAS, G. P.; FERRAZ, E. P.; OLIVEIRA, F. S.; ALMEIDA, A. L. G.; WEFFORT, D.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 38, n. 4, p. 481–490, 2020.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 14, p. 2724–2752, 2012.

TANG, Y. L.; ZHAO, Q.; ZHANG, Y. C.; CHENG, L.; LIU, M.; SHI, J.; YANG, Y. Z.; PAN, C.; GE, J.; PHILLIPS, M. I. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. **Regulatory Peptides**, v. 117, n. 1, p. 3–10, 2004.

TEVLIN, R.; WALMSLEY, G. G.; MARECIC, O.; HU, M. S.; WAN, D. C.; LONGAKER, M. T. Stem and progenitor cells: advancing bone tissue engineering. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 6, n. 2, p. 159–173, 2016.

TÓTOLI, G. G. C. **Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do tecido ósseo.** 2020. 66 f. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 2010.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402–1416, 2005.

ZIGDON-GILADI, H.; BICK, T.; LEWINSON, D.; MACHTEI, E. E. Co-Transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells promote neovascularization and bone regeneration. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n. 2, p. 353–359, 2015.

## ANEXO A


<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto</small> <b>CEUA</b> <small>Comissão de Ética no Uso de Animais</small>	<b>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</b> <b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
--	---

## CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da combinação de injeções locais de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração de defeitos ósseos da calvária de ratos", Protocolo nº 2019.1.577.58.8, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 25/09/2019.

Vigência do Projeto	04/10/2019 a 01/09/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	80
Peso/idade	150g-200g / 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2019.

  
**Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais