



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-
FACIAL E PERIODONTIA**

NATACHA MALU MIRANDA DA COSTA

**Efeito de arcabouços 3D funcionalizados com aptâmeros anti-
fibronectina na formação do coágulo e na osteogênese. Estudo
ex vivo e *in vivo*.**

**RIBEIRÃO PRETO
2022**

NATACHA MALU MIRANDA DA COSTA

Efeito de arcabouços 3D funcionalizados com aptâmeros anti-fibronectina na formação do coágulo e na osteogênese. Estudo *ex vivo* e *in vivo*.

Versão Corrigida

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP USP) como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontologia (periodontia)

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto.

RIBEIRÃO PRETO

2022

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 Pública
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Da Costa, Natacha Malu Miranda

Efeito de arcabouços 3D funcionalizados com aptâmeros anti-fibronectina na formação do coágulo e na osteogênese. Estudo *ex vivo* e *in vivo*.

*p. 103: il; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Periodontia. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Palioto, Daniela Bazan

1. Aptâmeros; 2. Arcabouço 3D; 3. Fibronectina; 4. Coágulo; 5. Osteoblastos; 6. Regeneração.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Da Costa, NMM. **Efeito de arcabouços 3D funcionalizados com aptâmeros anti-fibronectina na formação do coágulo e na osteogênese. Estudo *ex vivo* e *in vivo*.**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP USP) como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontologia (periodontia)
Área de concentração: Periodontia

Aprovada em ____ / ____ / 2022

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a). Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a). Dr.(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Trabalho realizado no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP – USP), nos laboratórios de Cultura de Células da FORP - USP, de Biologia Molecular da FORP - USP, de Histologia da FORP - USP, no LAB 3D BIO da FORP – USP, de Microscopia Multifóton Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP), de Microscopia Eletrônica da FMRP – USP, no de Citometria de Fluxo do Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP - USP), no de Microtomografia Computadorizada da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da Universidade de Campinas (UniCamp) e pela empresa NOVOGENE INCORPORATION. Todos os experimento e análises tiveram o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Auxílio à Pesquisa (#18/12036-3) e Bolsa de Doutorado (#18/16925-7).

Dedicatória

Ao meu pai **Paulino**, à tia **Mena** e à
minha avó **Amenayde** (in memoriam),
dedico à vocês essa tese. Vocês são
meu apoio incondicional, meu mastro,
meu prumo.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À minha grande orientadora Professora Dra. Daniela Bazan Palioto agradeço toda credibilidade, confiança, paciência nos meus momentos de desânimo, aconselhamento, orientação, apoio incondicional, amizade e carinho ao longo desses 5 anos e meio de doutoramento. Você é uma mulher inspiradora, com muita força, caráter e coragem. Lhe admiro demais.

Aos professores do PPG-Perio, Arthur Belém Novaes-Júnior, Flávia Furlaneto, Michel Messoro, Mario Taba e Sérgio Scombatti, obrigada por todo ensinamento adquirido na nossa especialidade. A periodontia é uma ciência única, e vocês me fizeram ter um amor incondicional por ela.

À querida e estimada funcionária do Departamento de Cirurgia Bucal-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP USP, Isabel Gobbo. Minha eterna gratidão por toda ajuda e solicitude. Você foi um anjo na minha vida e sempre pensa ao próximo. Se estou conseguindo finalizar essa longa e árdua fase, pode ter certeza de que você ajudou nessa caminhada.

Ao Técnico Roger Fernandes, muito obrigada por ter me recebido tão bem nos meus primeiros meses de adaptação em Ribeirão Preto. Foram tempos difíceis e você me recebeu de braços abertos no Laboratório de Cultivo Celular. Obrigada por todo ensinamento, carinho, respeito e amizade.

Aos meus amigos de convivência, moradia e de pesquisa, Cristhiam Hernandez e Pedro Felix. Vocês foram a melhor aquisição de amizade ao longo desses anos. Vivemos de corpo e alma a vida de um pós-graduando. Abraçamos a causa e lutamos até hoje. Muito obrigada pela incondicionalidade dessa relação de amizade somativa. Obrigada por me aturarem e por serem o meu consolo (e estresse também - risos) nas etapas mais difíceis dessa trajetória. Aprendemos, brigamos, lutamos e nos ajudamos muito. Amizade verdadeira é isso, e se depender de mim, nunca nos afastaremos.

Aos amigos do PPG-Perio, Ana Hernandez, Uislen Cadore, Lucia Moitrel, Diana Ramos, Atila Nobre, Marília Reis, Felipe Torres, Gisele Silva, Karine Figueiredo, Mariana Sales e Ana Clara Portela. A amizade é luz, é vida, presente e alegria. É coisa para se ter e enxergar a si mesmo no outro. Obrigada por estarem presentes e pela preocupação.

À equipe de pesquisa L-PRF do professor Michel Messoro, que me fez ficar próxima desse grupo unido e seletivo de alunos da pós-graduação Débora Souza,

Gabriel David, Ricardo Denardi, Ulli Costa e Raphael Matini. Obrigada pela amizade e carinho. Cresci muito trabalhando com vocês.

Às amigas do Laboratório de Cultivo Celular Raiana Bighetti, Luciana Almeida e Thaís Moré. Em momentos de solidão e desespero, vocês foram minha luz, minha esperança, minha guia. Deram soluções em fases substanciais para o desenvolvimento do meu projeto de doutorado. Obrigada por todo o ensinamento, amizade e respeito.

Aos técnicos laboratoriais Daniela (clínica de periodontia), Adriana, Milla, Fabíola, Gustavo, Roberta, Denise, José, Vani e Adriano (Fop Unicamp), obrigada pelos ensinamentos e apoio técnico para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP USP, Dulce e Daniela, por auxiliarem em trâmites burocráticos.

À equipe de pesquisadores da Universidade de Parma, Guigo Macaluso, Benedetta Ghezzi e Ludovica Parisi, obrigada pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Rafael Lima por ter sido meu mentor e me orientar a seguir a área da pesquisa na época da graduação. Além disso, mantemos um grande elo de amizade e admiração até os dias atuais. Muito obrigada pelo incentivo e carinho.

Ao professor Dr. João Pinheiro pela amizade e por todo ensinamento transmitido ao longo do mestrado, principalmente relacionado à microscopia e as análises de imuno-histoquímica. Esse aprendizado foi imprescindível para finalização dos experimentos associados ao meu doutoramento.

À Família Ximenes, Ana Carolina, Carlos, Cleide e Gustavo, obrigada pela afetividade ao longo desse período em que mantivemos contato enquanto eu morava em Ribeirão Preto. Vocês foram uma família para mim.

Aos familiares Renan, Camila, minha mãe Wânia, Geberth, Valéria, Mateus, Tia Ana, Alan, vovô Waldomiro, Tia Mara, Thiago, Aline, Tio Getúlio, Solange, e aos meus sobrinhos Hugo, Julia e Sophia, obrigada por toda credibilidade, admiração e incentivo. Vocês fazem parte da minha trajetória.

Aos amigos de longa data Eduardo Lana, Nayana Moraes, Susy, Tio Ivan (e família), Tâmilis, Camila, Paola, Nicole, Amanda, Bethânia, Ana Paula,

Louise, Felipe, Walessa, Lara, Dionísio, Bruno, Luís e Thadeu, vocês me inspiram muito até hoje e obrigada pelo incentivo.

Ao grupo de trabalho da FACI Wyden, em especial ao meu chefe Alvaro Azevedo pela oportunidade em trabalhar com ele e sua equipe, e também pela compreensão nessa reta final da entrega da tese de doutorado.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por todo suporte estrutural, possibilitando o desenvolvimento da pesquisa.

À CAPES por ter cedido no início da pós-graduação uma bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro nas modalidades Bolsa de Doutorado (processo 2018/16925-7) e Auxílio Regular à Pesquisa (processo 2018/12036-3) para a realização do projeto de doutorado.

Resumo

RESUMO

DA COSTA, N.M.M. **Efeito de arcabouços 3D funcionalizados com aptâmeros anti-fibronectina na formação do coágulo e na osteogênese. Estudo *ex vivo* e *in vivo*.** Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022, 103 p.

Na odontologia, o uso de arcabouços tridimensionais tem sido empregado na regeneração óssea maxilo-facial. A adsorção de moléculas bioativas sobre a superfície de arcabouços (SCA) possivelmente otimize a osteogênese. Assim, nessa pesquisa avaliou *ex vivo*, *in vitro* (osteoblastos - OSB) e *in vivo* (defeito em calvária em 5 e 15 dias) o efeito da funcionalização de SCA (quitosana +20% de β -TCP) com aptâmeros (APT) anti-fibronectina (anti-FN) na osteogênese. A funcionalização dos SCA foi realizada com 20 μ g de APT por simples adsorção. O coágulo fisiológico (PhC) foi desenvolvido por 16 horas sobre os SCA com ou sem aptamêros (APT) em defeitos críticos criados em calvária de ratos, caracterizando o estudo *ex vivo*. Em seguida, os OSB foram cultivados sobre o PhC formado nos SCA com e sem APT. Os ensaios *in vitro* foram realizados nos SCA sem PhC. A morfologia dos OSB e do PhC foi verificada por MEV. A caracterização celular do PhC foi realizada por citometria de fluxo (CF). A viabilidade celular, acúmulo de matriz mineralizada e expressão de ALP e BSP foram investigadas por MTT, ARS e IF, respectivamente. Adicionalmente, a expressão dos genes *Alp*, *Runx2*, *Bsp*, *Ocn* e *Tgf-B1* foi verificada por RT-PCR. No experimento *in vivo*, foram realizadas as análises de Micro-CT, morfometria por coloração de tricrômio de Masom, IF, análise transcriptômica por RNAseq e RT-PCR em 5 e 15 dias nos grupos SCA e SCA+APT. Os resultados *ex vivo* mostraram elevada imunomarcagem da ALP e IBSP no grupo com APT. A CF revelou maior detecção de CD90, CD45 e CD44 no PhC formado no mesmo grupo. Na MEV foi observada uma densa rede de fibrina enriquecida, composta com diferentes tipos celulares no PhC do SCA com APT. O RT-PCR mostrou mais expressão do gene *Tgf- β 1* no grupo SCA+APT+PhC+OSB. Em relação aos ensaios *in vitro* (sem o PhC) houve mais formação de matriz mineralizada em SCA+OSB+APT em 10 dias. O mesmo foi observado na IF evidenciando mais imunomarcagem da IBSP em SCA+APT+OSB, enquanto a ALP foi mais prevalente no grupo com SCA+OSB. Nas análises *in vivo*, o Micro-CT revelou maior volume ósseo e menos porosidade óssea em 5 dias em SCA+APT. Além disso, houve mais formação de tecido colágeno, alguns pontos de formação óssea e elevada expressão da ALP no grupo APT em 5 dias, enquanto a expressão de RUNX2 foi mais predominante em SCA+APT 15 dias. Houveram mais genes diferencialmente expressos em 15 dias, segundo o RNAseq. A ontologia gênica (GO), mostrou diferenças nas funções biológicas associadas à adesão celular e aos canais iônicos da membrana celular. Em 15 dias, essa diferença foi associada à resposta imune, aos componentes da MEC, da atividade antioxidante e da polimerização do citoesqueleto celular (regulada negativamente). Esses achados foram validados verificando a expressão dos genes *Vim*, *Hprt1*, *Cln4*, *Cd24*, *Krtap7-1*, *Psme2*, *Tnf* e *Il-1 β* . Em conjunto, os resultados mostraram que o APT proporciona melhora no padrão de coagulação, na diferenciação osteoblástica e nos eventos iniciais associados à osteoimunologia.

Palavras-chave: Coágulo; Aptâmeros; Hidrogel; Arcabouços 3D; Biomaterial; Fibronectina; Regeneração óssea, Análise transcriptômica.

Abstract

ABSTRACT

DA COSTA, N.M.M. **Effect of 3D scaffolds functionalized with anti-fibronectin Aptamers on blood clot formation and osteogenesis. *Ex vivo* and *in vivo* study in rats.** 2022. 103 p. Ph.D.Tesis (doutorate) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

In dentistry, the use of three-dimensional scaffolds (SCA) has been used in maxillofacial bone regeneration. The adsorption of bioactive molecules on SCA surface possibly optimizes osteogenesis. Thus, in this research were evaluated, *ex vivo*, *in vitro* (osteoblasts - OSB) and *in vivo* (calvaria defect at 5 and 15 days) the effect of SCA functionalization (chitosan +20% b-TCP) with anti-fibronectin aptamers (APT) on osteogenesis. SCA functionalization was performed with 20 µg of APT by simple adsorption. The physiological coagulum (PhC) was developed for 16 hours on the SCA with or without APT in critical defects created in rat calvaria, characterizing the *ex vivo* study. Then, the OSB were cultured on the PhC formed on SCA with and without APT. *In vitro* assays were performed on SCAs without PhC. The OSB and PhC morphology was verified by SEM. The cellular characterization of PhC was performed by flow cytometry (CF). Cell viability, mineralized matrix accumulation and ALP and BSP expression were investigated by MTT, ARS and IF, respectively. Additionally, the *Alpl*, *Runx2*, *Bsp*, *Ocn* and *Tgf-B1* gene expression was verified by RT-PCR. In the *in vivo* experiment, Micro-CT, morphometry by Masom's trichrome staining, IF, transcriptomic analysis by RNAseq and RT-PCR were performed at 5 and 15 days in the SCA and SCA+APT groups. The *ex vivo* results showed high ALP and IBSP labelind in the APT group. FC revealed greater detection of CD90, CD45 and CD44 in PhC formed in the same group. In SEM, a dense fibrina enriched network was observed, composed of different cell types in PhC formed on SCA with APT. RT-PCR showed more *Tgf-β1* gene expression in the SCA+APT+PhC+OSB group. In relation to *in vitro* assays (without the PhC) there was more formation of mineralized matrix in SCA+APT+OSB group in 10 days. The same was observed in IF, showing more immunostaining of IBSP in SCA+APT+OSB, while ALP was more prevalent in the SCA+OSB group. In *in vivo* analyses, Micro-CT revealed greater bone volume and less bone porosity at 5 days in SCA+APT. In addition, there was more collagen tissue formation, some bone formation points and increased ALP expression in the APT group at 5 days, while RUNX2 expression was more predominant in SCA+APT at 15 days. In RNAseq showed more differentially expressed genes in 15 days. Gene ontology (GO) showed differences in biological functions associated with cell adhesion and cell membrane ion channels. At 15 days, this difference was associated with the immune response, ECM components, antioxidant activity and cellular cytoskeleton polymerization (downregulated). These findings were validated by verifying *Vim*, *Hprt1*, *Clcn4*, *Cd24*, *Krtap7-1*, *Psme2*, *Tnf* and *Il-1β* gene expression. Taken together, these results showed that APT improves the coagulation pattern, osteoblastic differentiation and early events associated with osteoimmunology.

Key words: Blood Clot; Aptamers; Hydrogel; 3D scaffolds; Biomaterial; Fibronectin; Bone regeneration, transcriptomic analysis.

Listas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas associadas à funcionalização do SCA com APT anti-FN..... 46
- Figura 2.** Esquema mostrando o resultado da funcionalização APT anti-FN, mostrando sua adsorção sobre os filamentos do SCA (A). Após a funcionalização, o SCA era inserido nos defeitos críticos criados em calvária de ratos por 16 horas para a formação do PhC (B). Após esse período, o PhC juntamente com o SCA era removido e direcionado para o cultivo celular dos osteoblastos (OSB), caracterizando o ensaio *ex vivo* (C)..... 48
- Figura 3.** Ensaios *ex vivo* realizados para o desenvolvimento do capítulo 1..... 48
- Figura 4.** (A) - Dot-plot mostrando as populações celulares detectadas no PhC formado nos grupos experimentais avaliados por citometria de fluxo. A população de células selecionadas no PhC formada sobre os SCA foi semelhante em cada grupo, variando em tamanho e complexidade das células; (B) - Gráfico mostrando maior expressão de CD90 (*), CD45 (**) e CD44 (***) em SCA+APT+PhC quando comparado a SCA+PhC; (C) - Histogramas mostrando a média em percentual de células marcadas para CD90, CD45, CD34, CD44, CD42 e CD61 em cada grupo; (D) Eletrofotomicrografias mostrando os grupos SCA+PhC (D.1, D.5, D.9), SCA+APT+PhC (D.2, D.6, D.10), SCA+PhC+OSB (D.3, D.7, D.11) e SCA+APT+PhC+OSB (D.4, D.8, D.12) nos aumentos de 100x (D.1-D.4), 1000X (D.5 - D .8) e 2000x (D.9 – D.12). Cabeça de seta (D.9-D.12) e seta (D.11) mostrando diferentes tipos de células nos PhC

formados sobre os SCA. Escala: 10 μm e 100 μm . Valor da significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 56

Figura 5. (A) – Resultados do ensaio de MTT; (B) – Gráficos mostrando os resultados de RT-PCR, evidenciando diferença na expressão gênica do *Tgf- β 1* (*) entre os grupos investigados; (C) – Ensaio de mineralização em 7 dias; (D)- Ensaio de mineralização em 10 dias. Valor da significância: * $p < 0.05$ 58

Figura 6. Imagens de imunofluorescência obtidas em microscopia multifóton nas objetivas de 5x (A e G) e 20x (B e H) mostrando a morfologia dos OSB sobre o PhC formado em SCA funcionalizado (A-F) e não funcionalizado (G-L) com APT. Imagens 3D dos OSB sobre o PhC formado nos SCA com (C) e sem APT (I), ilustrando mais densidade dos OSB no grupo com APT. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (D e J), ALP com Alexa Fluor 594 (E e K) e IBSP com Alexa Fluor 488 (F e L). A imunexpressão da ALP (M) e IBSP (N) no grupo SCA+APT+PhC+OSB foi maior quando comparado ao grupo SCA+PhC+OSB. Escala: 20 μm e 50 μm e. Valor da significância: *** $p < 0,001$ 60

Figura 7. Delineamento experimental das análises desenvolvidas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* no capítulo 2..... 67

Figura 8. Eletrofotomicrografias mostrando os grupos SCA+OSB (A - C) e SCA+APT+OSB (D - F) no aumento de 100x (A e D), 1000X (B e E) e 2000x (C e F). O ensaio de MTT (G) não detectou diferença entre os grupos. Os gráficos do ensaio de mineralização em 7 dias (H) e em 10 dias (I) revelaram diferença em 10 dias (*) entre os grupos investigados. As imagens de imunofluorescência mostram os OSB cultivados sobre os SCA não funcionalizados (J – O) e funcionalizados

(P - T) com APT. A região selecionada (retângulo amarelo) nas imagens no aumento de 5x (J e P) estão em maior aumento na objetiva de 20x (L e Q). O IBSP foi marcado com Alexa Fluor 488 (M e R), a ALP com Alexa Fluor 594 (N e S) e núcleo com DAPI (O e T). A imunoposição de ALP (U) no grupo SCA+ATP+OSB (***) foi maior. A marcação IBSP (V) foi mais intensa no grupo SCA+OSB (*). Escala: 10 µm, 20 µm, 50 µm e 100 µm. Valor de significância: * p <0,05, *** p <0,001).....

78

Figura 9. (A.1-A.4) - Reconstruções 3D dos defeitos ósseos preenchidos com biomaterial em diferentes grupos experimentais avaliados. A.5-A.8: gráficos mostrando os resultados das variáveis investigadas pelo Micro-CT. (B.1-B.4) - Coloração com tricrômio de Mason em 1,6x. B.5: gráfico mostrando os resultados da morfometria realizada para quantificar o colágeno formado. (B.6-B.9) - coloração com tricrômio de Mason em 20x.(B.10) - Gráfico mostrando os resultados da morfometria realizada para quantificar o osso neoformado. (C.1-C.4) - Imagens sobrepostas de imunofluorescência dos antígenos avaliados. (C.5) - gráfico apresentando a diferença estatística detectada ao comparar a imunoposição da ALPL. (C.6-C.9) - Imunofluorescência de ALPL (Alexa Flúor 594). (C.10-C.13) - Imunomarcção da RUNX2 (Alexa Flúor 499). (C.14) - Gráfico ilustrando a comparação realizada em relação à imunodeteção da RUNX2. (C.15-C.18) - Núcleo evidenciado com o DAPI. Escala: 100 µm e 50 µm. Valor da significância: *p<0,05.....

81

Figure 10. (A) - Gráficos compilados dos componentes principais 1 (PC 1) e 2 (PC 2) para todas as amostras analisadas nos grupos SCA e SCA+APT em 5 e 15 dias. (B) - DEGs em 5

dias. (C) - DEGs em 15 dias. (D) - GO em 5 dias. (E) - Validação da GO em 5 dias. (F) - GO em 15 dias. (G) - Validação da GO em 15 dias. (H) - Heatmap dos genes associados à diferenciação osteoblástica. (I) - Validação dos genes associados à diferenciação osteoblástica. Valor da significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ **85**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) usadas no ensaio de RT-PCR no estudo <i>ex vivo</i>	54
Tabela 2 - Sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) utilizadas no RT-PCR para validação dos genes do RNAseq e associados à diferenciação osteoblástica.....	75
Tabela 3 - Resultados do QC da análise transcriptômica por RNAseq dos grupos em diferentes períodos experimentais.....	82
Tabela 4 - Descrição dos termos da GO com seus identificadores (GO ID), o raio de genes avaliados (Gene ratio), valor de p , valor de p ajustado (padj) e sigla dos DEGs envolvidos nas funções descritas, observados no RNAseq.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - Tridimensionais	IBSP - Sialoproteína Óssea
ALP - Fosfatase Alcalina (ALP)	Il-1β - Interleucina 1 Beta
Alp - Fosfatase alcalina do fígado/osso/rim	IM - Intramuscular
anti-FN - Anti-Fibronectina	Krtap7-1 - Queratina Associada à Proteína 7-1
ARS – Vermelho de Alizarina	LIAREC - Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares
AT - Área Total	LMME - Laboratório de Microscopia Eletrônica Multiusuário
ATP - Aptâmeros	LMMM - Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifóton
Bglap - Proteína Óssea Contendo Ácido Gama-carboxiglutâmico (Osteocalcina/oc)	MEC - Matriz Extracelular
bp - Pares de Bases	MEV - Microscopia Eletrônica de varredura
BP - Processos Biológicos	MF - Funções Moleculares
BSA - Albumina de Soro Bovino	Micro-CT - Micro-Tomografia Computadorizada
BV - Volume Osseo	min - Minutos
CC - Componentes Celulares	ODB - Osteoblastos
CD - Agrupamento de Diferenciação	Padj – Valor de p Ajustado
Cd24 - Agrupamento de diferenciação 24	PB - Tampão Fosfato
cDNA - DNA Complementar	PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
CF - Citometria de Fluxo	PC - Componentes Principais
Clcn4 - Canais de Cloreto Dependentes de Voltagem 4	PhC - Coágulo Fisiológico
CTM - células-tronco mesenquimais	PO tot - Porosidade Óssea
DEGs - Genes Diferencialmente Expressos	Psme2 - Complexo Ativador do Proteossoma - Subunidade 2
D-MEM - Meio Eagle Dulbecco Modificado	QC - Controle de Qualidade
EDTA - etilenodiaminotetracético	RBC - Células Sanguíneas Vermelhas
FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto	REDOX - Oxidação-redução
FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto	RIN - Integridade do RNA
FN - Fibronectina	ROI - Região Óssea de Interesse
FPKM - Milhões de Pares de Bases Sequenciadas	ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
Gapdh - Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase	RPM - rotações por minuto
GB - Gigabites	RT - Temperatura Ambiente
GF - Fatores de Crescimento	RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
GO - Ontologia Gênica	Runx2 - Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2
HA - Hidroxiapatita	SCA - Arcabouços
hr - horas	

SELEX - Método de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial

SFB - Soro Fetal Bovino

TB.PF - Padrão trabecular

TB.TH - Espaçamento de trabéculas

TCEP - Tris(2-carboxietil)fosfina

Tgf- β 1 - Fator de Crescimento Transformador beta

Tnf - Fator de Necrose Tumoral

TV - Volume Total

USP - Universidade de São Paulo

Vim - Vimentina

VOI - Volume Ósseo de Interesse

WBC - Células Sanguíneas Brancas

β -TCP - beta-Fosfato Tricálcico

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.....	102
--------------	-----

Sumário

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	36
Objetivo geral.....	42
Capítulo 1.....	44
CAPÍTULO 1: APTÂMERO ANTI-FIBRONECTINA MODIFICAM O PADRÃO DO COÁGULO SANGUÍNEO E ESTIMULA A OSTEOGÊNESE. UM ESTUDO EX VIVO.....	45
1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
1.2.1. Aspectos éticos.....	45
1.2.2. Confeção do APT e dos SCA 3D.....	45
1.2.3. Funcionalização dos SCA com APT.....	45
1.2.4. Formação do coágulo sanguíneo “fisiológico”.....	47
1.2.5. Ensaio <i>ex vivo</i>	48
1.2.5.1. Citometria de fluxo.....	49
1.2.5.2 Cultivo dos OSB sobre o substrato formado.....	50
1.1.1.1. Viabilidade celular por MTT.....	50
1.2.5.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	50
1.2.5.5. Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	51
1.2.5.6. Morfologia celular e análise tridimensional de substrato por microscopia confocal	52
1.2.5.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)...	53
1.2.6. Análise estatística	54
1.3. RESULTADOS.....	54
1.3.1. CD90, CD45 e CD44 são mais expressos no PhC formado no SCA com APT.....	54
1.3.2. O APT proporcionou a formação de um PhC rico em células brancas sanguíneas.....	55
1.3.3. APT não interfere na viabilidade das células OSB e PhC.....	57
1.3.4. Expressão gênica do TGF- β 1 foi elevada no grupo APT.....	57
1.3.5. O APT não interferiu na formação da matriz mineralizada.....	57

1.3.6.	A imunomarcção da ALP e da IBSP foi elevada no grupo APT.....	58
1.4.	DISCUSSÃO	61
1.5.	CONCLUSÕES	64
	CAPÍTULO 2	65
	CAPÍTULO 2: PERFIL TRANSCRIPTÔMICO E ONTOLÓGICO DESENCADEADO POR SCA 3D FUNCIONALIZADOS COM APTÂMEROS ANTI-FIBRONECTINA NA OSTEOIMUNOLOGIA	66
2.1.	MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1.1.	Confecção do APT e dos SCA 3D.....	66
2.1.2.	Funcionalização dos SCA com APT.....	66
2.1.3.	Ensaio <i>In vitro</i>	67
2.1.3.1.	Cultivo dos OSB sobre os SCA.....	67
2.1.3.2.	Viabilidade celular por MTT.....	67
2.1.3.3.	MEV.....	68
2.1.3.4.	Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	68
2.1.3.5.	Imunofluorescência da ALP e IBSP em microscopia confocal	68
2.1.4.	Ensaio <i>In vivo</i>	68
2.1.4.1.	Delineamento experimental.....	69
2.1.4.2.	Procedimento cirúrgico.....	69
2.1.4.3.	Análise em Micro-CT.....	70
2.1.4.4.	Processamento histológico.....	71
2.1.4.5.	Morfometria utilizando coloração Tricrômio de Masson.....	71
2.1.4.6.	Imunofluorescência de dupla marcação.....	72
2.1.4.7.	Avaliação da imunomarcção.....	72
2.1.4.8.	Análise transcriptômica por RNAseq.....	72
2.1.4.9.	Bioinformática.....	74
2.1.4.10.	Validação do RNAseq e da ontologia por RT-PCR.....	75
2.1.5.	Análise estatística.....	76
2.2.	RESULTADOS	76
2.2.1.	Ensaio <i>in vitro</i>	76

2.2.1.1.	O APT não interferiu na morfologia dos OSB.....	76
2.2.1.2.	O APT não interfere na viabilidade das células OSB.....	76
2.2.1.3.	O APT promoveu mais deposição de matriz mineralizada em 10 dias.....	77
2.2.1.4.	A imunodeteção da ALP e da IBSP foi diferente em cada grupo.....	76
2.2.2.	Ensaio <i>in vivo</i>	79
2.2.2.1.	Micro-CT.....	79
2.2.2.2.	Coloração de Masson.....	79
2.2.2.3.	Imunofluorescência da ALP e da RUNX2.....	80
2.2.2.4.	Análise transcriptômica.....	82
2.2.2.5.	Validação da ontologia.....	83
2.3.	Discussão	87
2.4.	Conclusões	90
	Considerações finais	91
	Referências	93
	Anexo	101
	Anexo A	102

Introdução

INTRODUÇÃO

Biomateriais de diversas origens têm sido amplamente utilizados em terapias regenerativas (BENCHERIF et al., 2013; BROUWER et al. 2015; CHEN & LIU, 2016). Neste contexto, o processo regenerativo depende, substancialmente, do tipo celular que repovoar esses biomateriais após a instalação do coágulo sanguíneo (DAVIES et al., 2003). O sangue é o primeiro componente a entrar em contato com os biomateriais (TEJERO et al., 2013), possibilitando a formação do coágulo e, subseqüentemente, dando origem ao novo tecido (SHIU et al., 2014).

O fenômeno biológico da coagulação sanguínea compreende uma série de acontecimentos quimiotáticos e biomoleculares mediados por diferentes tipos celulares (SHIU et al., 2014; DAVIS et al., 2016). O principal objetivo da coagulação, após um dano endotelial (NURDEN, 2007), é produzir hemostasia e servir como arcabouço para o recrutamento de células relacionadas ao reparo local (PHILIPS, 2005; SHIU et al., 2014). Isso possibilitará a formação da matriz extracelular (MEC) provisória, que seguirá amadurecendo para se tornar um novo tecido, preferencialmente com arquitetura e funções semelhantes às existentes no tecido original (HANKENSON et al., 2015). Esse repovoamento depende, em grande escala, do estímulo do biomaterial sobre o coágulo sanguíneo.

Na reconstrução oral, biomateriais são comumente usados como arcabouços que possibilitem a restauração da integridade óssea (BROUWER et al., 2015; CHEN & LIU, 2016). Por sua vez, os arcabouços (SCA, sigla em inglês) tridimensionais (3D) têm sido entendidos como sendo os mais interessantes (ASTI et al., 2014) pois proporcionam uma distribuição celular homogênea e, conseqüentemente, alta osteocondutividade (KARAGEORGIU et al., 2005; ANNABI et al., 2010; SHORT et al., 2015). A organização 3D garante a propagação de nutrientes e oxigênio, principalmente mediante a ausência de vasos sanguíneos nos enxertos (PARK et al., 2009; BERTASSONI et al., 2014). Além disso, o contato célula-célula ou célula-MEC se dá de forma mais harmônica, como no ambiente natural (BERTASSONI et al., 2014).

Diversos materiais têm sido elaborados para a preparação destes SCA 3D (GUNATILLAKE & ADHIKARI, 2003; LIU & MA, 2004; ASTI et al., 2014;

THRIVIKRAMAN et al., 2017). Dentre eles, o hidrogel é um candidato ideal neste quesito (Bencherif et al., 2013).

O hidrogel é um composto altamente hidrofílico com excelentes propriedades biológicas (PEPPAS et al., 2000). Ele pode ser constituído por polímeros naturais, derivados de componentes semelhantes ao da MEC (colágeno, gelatina, fibrina, ácido hialurônico) ou à de algas marinhas (alginato, agarose e quitosana) (MUZZARELL et al., 1993; LEE & MOONEY, 2001; SHORT et al., 2015), ou polímeros químicos/sintéticos (derivados de óxido de etileno, álcool vinílico, ácido acrílico, propileno fumarato-co-etilenoglicol e polipeptídeos) (LUTOLF & HUBBELL, 2003; CRESCENZI et al., 2007). Os polímeros naturais demonstram reduzida toxicidade e elevada biocompatibilidade, enquanto os sintéticos, apesar de poderem gerar alguma toxicidade, demonstram melhor taxa de biodegradação e propriedades físico-mecânicas (ASTI et al., 2014; SHORT et al., 2015).

O hidrogel, quando em contato com células progenitoras possibilita seu crescimento, proliferação e diferenciação (TERRACIANO et al., 2007), além de permitir a inclusão de fármacos (SONG et al., 2015) e/ou fatores de crescimento (DU et al., 2015), proporcionando sua gradativa liberação.

Dentre os hidrogéis naturais, a quitosana tem sido alvo de intensas investigações, objetivando utilizar suas propriedades na elaboração de arcabouços 3D voltados à regeneração óssea (SU et al., 2014; MAJI et al., 2016; PARISI et al., 2017). Por apresentar características mecânicas e composição semelhante à da MEC, ela tem demonstrado ser um excelente biomaterial voltado para a elaboração de membranas relacionadas à regeneração tecidual guiada na periodontia (QASIM et al., 2017). Além disso, esse hidrogel tem atividade antimicrobiana eficaz contra vários patógenos orais (COSTA et al., 2012).

Esse biopolímero tem se destacado para ser utilizado devido a sua capacidade de estimular a osteocondução, favorecendo a dinâmica do reparo ósseo (XU et al., 2021). É normal verificar a associação do beta-fosfato tricálcico (β -TCP) com este hidrogel, devido às suas excelentes propriedades de biodegradação, caracterizadas pela rápida absorção e substituição por nova matriz óssea (GUASTALDI et al., 2010). A combinação da quitosana com β -TCP fornece um processo restaurador alternativo para reparo ósseo. Juntos, ambos

estimulam a osteocondutividade óssea, favorecendo o aumento da formação da matriz óssea pelos osteoblastos (GE et al., 2004; XU et al., 2021).

Nesse biomaterial, componentes associados à MEC têm sido incorporados, objetivando a adsorção de moléculas específicas. Isso resulta na potencialização da adesão focal e organização do citoesqueleto celular, condicionando a célula a gerar respostas diferentes. Dentre eles, está a fibronectina (FN) (GALLI et al., 2016; PARISI et al., 2017).

A FN é uma proteína amplamente disponível no plasma sanguíneo, estando fortemente envolvida com as primeiras etapas relacionadas à hemostasia e trombogênese, principalmente por induzir à agregação plaquetária e fibrinogênese (WANG & NI, 2016; XU et al., 2016). No reparo tecidual, a FN é inicialmente depositada na malha de fibrina após a formação do coágulo sanguíneo (WANG & NI, 2016). Por meio dessa estrutura fibrilar, a FN reforçará a formação de um arcabouço que servirá para o recrutamento de células progenitoras (SCHULTZ et al., 2009). Além disso, essa importante proteína da MEC é indispensável em muitos processos fisiológicos (CHATAKUN et al., 2014; HALPER & KJAER, 2014).

Esta proteína desempenha um papel imprescindível na regeneração, servindo como substrato para a adesão celular (CHATAKUN et al., 2014). Na neoformação óssea, essa glicoproteína adesiva é conhecida por participar dos estágios iniciais da osteogênese (FAIA-TORRES et al., 2015). Adicionalmente, evidências demonstram que a FN pode servir como reservatório de inúmeros fatores de crescimento (GF, sigla em inglês) por permitir a ligação dos mesmos à sua estrutura (RAHMAN et al., 2005; WIJELATH et al., 2006; LIN et al., 2011, 2014; ZHU & CLARK, 2014). Isso conseqüentemente induzirá à uma migração celular aprimorada, além de propiciar a liberação desses GF de forma controlada, tornando suas atuações específicas, intensas e prolongadas (ZHU & CLARK, 2014). Mediante isso, tem sido proposto a utilização da FN na biofuncionalização de biomateriais voltados à regeneração óssea (RAPUANO et al., 2012; PALACHUR et al., 2014). Nesse contexto, a associação de Aptâmeros (APT) à biomateriais foi proposta como estimulador regenerativo (GALLI et al., 2016; PARISI et al., 2017).

Os APT são oligonucleotídeos (pequenos filamentos de DNA ou RNA) que irão atuar por meio de ligações químicas a sua molécula alvo (KEEFE et al.,

2010). Estes são produzidos a partir de grandes bibliotecas combinatórias de ácidos nucleicos, se ligando com alta afinidade e especificidade aos alvos, sendo amplamente utilizados para identificar e isolar células e moléculas funcionais (STOLTENBURG et al., 2007). Existem vários modos para a produção de APT, mas o mais utilizado se trata do Método de Evolução Sistemática dos Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX, sigla em inglês) (DARMOSTUK et al., 2015). O passo inicial do sistema SELEX é a síntese química *in vitro* de nucleotídeos aleatórios e sua respectiva ligação ao antígeno. Em seguida, as moléculas ligadas são amplificadas e selecionadas para obter APT específicos para o alvo (STOLTENBURG et al., 2007).

Apesar do seu uso estar consolidado na medicina, especialmente na oncologia (para detecção e tratamento de determinados cânceres) (ABRAHAM et al., 2017), na odontologia a relação dos APT com processos regenerativos tem começado a ser pesquisada (ADJOMANDI et al., 2016; ZANG et al., 2018). Sua abordagem varia desde a liberação contínua de determinados fármacos e fatores de crescimento (ASHRAFUZZAMAN, 2014) até sua ligação a tipos celulares específicos, como os osteoblastos (ADJOMANDI et al., 2013; 2016).

A funcionalização de SCA com agentes osteoindutores na regeneração óssea, como por exemplo os GF, é dada pela adsorção dessas proteínas específicas ao substrato, objetivando atrair células efetoras e, dessa forma, potencializar a osteogênese (VAQUETTE et al., 2018). Porém, a atuação dessas moléculas bioativas acaba não sendo sítio específico, além de apresentar meia-vida curta (LO et al., 2012), o que pode repercutir numa atuação reduzida do efeito local na fisiologia óssea. Além disso, desvantagens clínicas foram identificadas por dose/efeito não adequadamente individualizado e controlado (SHIELDS et al., 2006). A utilização de APT na funcionalização de SCA pode ser promissora – a molécula alvo propiciará ligações específicas às células e proteínas de interesse. Além disso, possuem elevada estabilidade e baixa imunogenicidade (MASCINI et al., 2012).

A capacidade dos APT para enriquecer biomateriais com moléculas alvo tem sido demonstrada *in vitro* (GALLI et al., 2016; PARISI et al., 2017). Nestes, o enriquecimento de diferentes SCA sintéticos com APT anti-FN levou à melhora da adsorção de proteínas específicas, quantitativamente e qualitativamente, além de aprimorar a adesão celular. Além disso, o potencial de ligação dos APT

foi demonstrado em células-tronco mesenquimais (CTM) (GUO et al., 2006) e osteoblastos (ARDJOMANDI et al., 2016). Esses dados sugerem a possibilidade de explorar esse método para ancorar moléculas desejadas na superfície dos arcabouços/biomateriais.

Assim, o objetivo deste trabalho é acessar o efeito de APT anti-FN funcionalizados em um SCA impresso tridimensionalmente, a base de quitosana e 20% de β -TCP, sobre a formação do coágulo e, conseqüentemente, na osteogênese.

Objetivo Geral

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar os padrões de coagulação fisiológica relacionados à SCA 3D enriquecidos com APT anti-FN e, além disso, ver o efeito desta associação nos eventos iniciais à formação óssea, em um estudo *ex vivo* e *in vivo*. Neste trabalho, foi abordado um modelo *ex vivo* utilizando coágulo fresco fisiológico formado em defeito crítico criado em calvária de ratos.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1: APTÂMERO ANTI-FIBRONECTINA MODIFICA O PADRÃO DO COÁGULO SANGUÍNEO E ESTIMULA A OSTEOGÊNESE. UM ESTUDO *EX VIVO*.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos de SCA 3D funcionalizados com APT anti-FN na formação do coágulo sanguíneo;
- Verificar o efeito do coágulo sanguíneo formado sobre os SCA no comportamento das células osteoblásticas, linhagem UMR-106.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (processo número 2018.1.247.58.7).

1.2.2. Confeção do APT e dos SCA 3D

Para esse estudo, APT com cadeia (fita) simples de DNA (5'- biotinTEG-Aptamer-thiol-3', ATW0008, Base Pair- Biotechnologies, EUA) com 40 nucleotídeos e 12.597,4 g/mol foram selecionados e rastreados contra a fibronectina (FN) por meio da tecnologia SELEX. A seleção do melhor clone que se liga ao alvo exigiu um período de duas semanas.

A confecção dos SCA 3D a base de quitosana e 20% de Beta- tricálcio fosfato (β -TCP) foi realizada em uma impressora 3D desenvolvida pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Parma (Parma, Itália), produzindo SCA com porosidade de 200 μ m, semelhante à das trabéculas ósseas. Essa parte da metodologia foi realizada pelo Departamento de Ciências Biomédicas, Biotecnológicas e Translacionais da Universidade de Parma (Parma, Itália).

1.2.3. Funcionalização dos SCA com APT

Essa etapa seguiu o protocolo como previamente descrito por Parisi e colaboradores (PARISI et al., 2017). Primeiramente, os APT foram hidratados com Resuspension Buffer (Base Pair- Biotechnologies®), resultando numa solução de 2000 μ g/mL. Previamente a funcionalização do SCA, foi adicionado

Reducing Buffer (1:1, Base Pair- Biotechnologies®) por 10 min, em Temperatura ambiente (RT, sigla em inglês). Os APT utilizados continham uma pequena cadeia de carbono contendo um disulfeto ligado à extremidade 3' e uma biotina na extremidade 5'. A solução Reducing Buffer, contendo cloridrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 2 mM, pH 7,8, permitiu a redução da cadeia dissulfeto ligada à extremidade 3' do APT, com a função de liberar os grupos tiols capazes de se ligarem à quitosana presente no SCA. Para eliminar o excesso de TCEP, que é tóxico para os ratos, a solução foi purificada com colunas cromatográficas para oligonucleotídeos mini Quick Spin Oligo Columns (Roche Life Science, EUA). Após purificação, o APT foi quantificado no espectrofotômetro Nanovue Plus™ (GE Healthcare, UK) e posteriormente diluído em Folding Buffer (Base Pair Biotechnologies®).

24 horas (hr) antes da funcionalização com o APT, SCA com 5 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram colocados em uma placa de Petri e desidratados em incubadora de câmara de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após sua desidratação, os SCA foram colocados em placas de 96 poços (Corning, EUA) e funcionalizados por simples adsorção com 20 µg de APT diluídos em Folding Buffer (Base Pair Biotechnologies®) por 17 hr. Passado esse período, essa solução foi removida e adicionada o tampão PB (Invitrogen, EUA). Para confirmar a funcionalização dos SCA, as soluções Folding Buffer e PB foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare®) (Figura 1). Se o valor emitido pelo equipamento estivesse próximo de zero, era um indicativo de que o APT não estava presente na solução e se aderiu aos SCA, demonstrando a efetividade do procedimento.

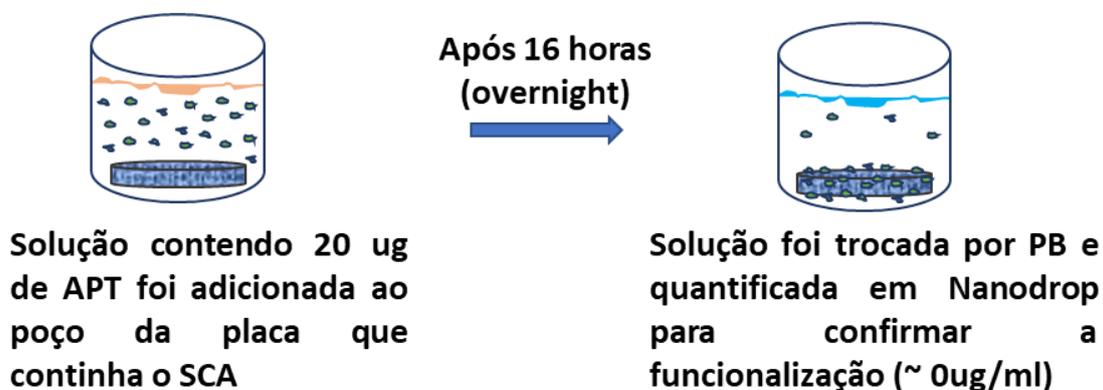


Figura 1. Etapas associadas à funcionalização do SCA com APT anti-FN.

1.2.4. Formação do coágulo sanguíneo “fisiológico”

Para a formação do coágulo *ex vivo*, foram utilizados ratos da raça Hannover, machos, com idade de 12 semanas, adquiridos no Biotério Central da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. O protocolo experimental foi modificado e adaptado por Monroe e colaboradores (MONROE et al., 2012). Inicialmente, os animais foram anestesiados com Xilazina (10mg/Kg, Syntec, BRA) e Ketamina (80mg/Kg, Syntec®), via intramuscular (IM). Após terem atingido plano anestésico profundo, os animais foram colocados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica, sendo realizada tricotomia na derme adjacente ao crânio, seguida de antissepsia com PVPI e uma incisão semilunar com bisturi 15C (Solidor, BRA). A derme foi deslocada junto com o periósteo usando o descolador Molt 2-4 (Hu-Friedy, ALE). Com a calvária exposta, para criação do defeito ósseo foi utilizado um motor elétrico BLM 500 VK (Driller, SP, BR), com um contra-ângulo redutor 16:1 com velocidade de 800 rotações por minuto (rpm), acoplado com uma broca trefina com 5 mm de diâmetro (Quinelato, BRA) e irrigação abundante com solução salina estéril. Durante a cirurgia, o segmento ósseo foi removido delicadamente com descolador Molt 2-4 (Hu-Friedy®), objetivando manter a dura-máter íntegra, visto que essa membrana é rica em células progenitoras. Após criação do defeito crítico em calvária, os SCA com e sem APT foram posicionados na loja óssea.

A incisão foi suturada com fio Nylon 4.0 (Ethicon, EUA). Com a cirurgia finalizada, o animal recebeu o analgésico cloridrato de tramadol Cronidor™ (2 mg/kg, Agener União, BRA), via subcutânea, sendo acompanhado até o retorno dos seus reflexos corneanos e mantidos em gaiolas individuais para a formação do coágulo fisiológico (PhC, sigla em inglês) no SCA inserido na calvária. Passado o período de 16 hr, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de Lidocaína à 10 mg/mL (0,7 mg/Kg) associada ao Tiopentato de sódio 2,5% (150 mg/kg), via IM, para retirada do biomaterial juntamente com o PhC e posterior ensaio *ex vivo* (Figura 2). O PhC removido da calvária foi mantido em PB (Invitrogen®) e direcionado para o cultivo celular para realização dos experimentos (Figura 3).

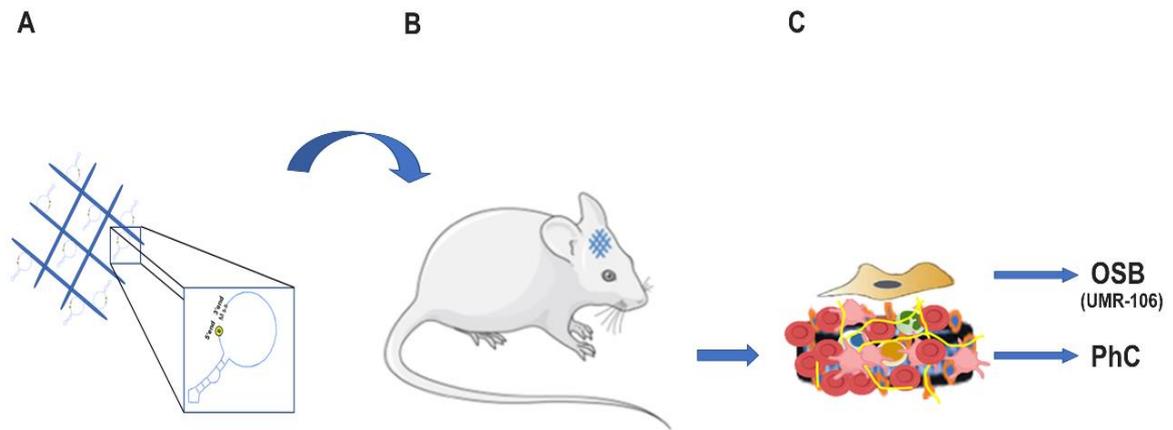


Figura 2. Esquema ilustrando o resultado da funcionalização com APT anti-FN, mostrando sua adsorção sobre os filamentos do SCA (A). Após a funcionalização, o SCA foi inserido nos defeitos críticos criados em calvária de ratos por 16 horas para a formação do PhC (B). Após esse período, o PhC juntamente com o SCA era removido e direcionados para o cultivo celular dos osteoblastos (OSB), caracterizando o ensaio *ex vivo* (C).

Métodos	Grupos
MTT	 n=3  n=3
Citometria de fluxo	 n=3  n=3
MEV	 n=3  n=3  n=3  n=3
Ensaio de mineralização	 n=3  n=3
Microscopia confocal	 n=3  n=3
RT-PCR	 n=3  n=3

Legenda das Figuras

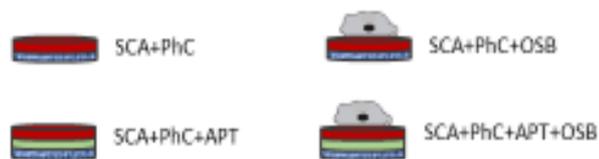


Figura 3. Ensaio *ex vivo* realizados para o desenvolvimento do capítulo 1.

1.2.5. Ensaio *ex vivo*

1.2.5.1. Citometria de fluxo

A caracterização da população celular presente no PhC formado sobre o SCA com e sem APT foi realizada citometria de fluxo no Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares (LIAREC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Inicialmente, o PhC foi formado conforme descrito anteriormente no protocolo cirúrgico. Em seguida, o PhC foi lavado gentilmente com tampão fosfato (PB, sigla em inglês, Gibco®) em placa de 24 poços (Corning®), RT. Para remover as células do PhC aderidas ao SCA, o substrato (SCA+PhC) foi tratado com 0,25% de tripsina (Gibco®) por 5 minutos (min), à RT. O bloqueio da atividade enzimática da tripsina foi realizado com o Meio Eagle Dulbecco Modificado (D-MEM, sigla em inglês) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)(Gibco®), à RT. As células removidas foram adicionadas em tubo Falcon de 15 mL (Corning®) e centrifugadas à 2000 rpm por 5 min. O “pellet” formado no tubo foi tratado com a solução de tampão de lise para hemácias RBC Lysis Life eBioscience™ (Thermo Fisher Scientific®), por 10 min, RT. As células restantes (glóbulos brancos) foram separadas em tubos Falcon para citometria de fluxo (BD-Biosciences Inc, EUA) na densidade de 1×10^5 células/tubo.

Para caracterização das células do PhC foram utilizados os anticorpos primários monoclonais anti-CD45 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD45/PE, BD-Biosciences®), anti-CD90 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD90/FITC, BD-Biosciences®), anti-CD34 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD34/PE- Santa Cruz Biotechnology, EUA), anti-CD44 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD44/FITC, BD-Biosciences®), anti-CD42 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD42/FITC - BD-Biosciences®) e anti-CD61 ($1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células, CD61/FITC, BD-Biosciences®). Eles foram diluídos em PB (Gibco®) e incubados por 30 min, RT. Os antígenos selecionados são marcadores de superfície específicos para linfócitos T e B, CTM, células progenitoras hematopoiéticas, leucócitos, plaquetas e fator de Von Willebrand de células endoteliais, respectivamente. Em seguida, as amostras foram fixadas com Paraformaldeído 4% (Merck Millipore, USA), diluídas em PB (1:1, Gibco®) e avaliadas pelo citômetro de fluxo BD FACsCanto™ II (BD Biosciences®). As análises foram realizadas pelo software BD FACSDIVA (BD Biosciences®) e os resultados

foram dados em porcentagem de células marcadas e média da intensidade de fluorescência (IF) para cada anticorpo.

1.2.5.2. Cultivo dos OSB sobre o substrato formado

Após atingir confluência em torno de 80% nas garrafas de cultivo celular, as células foram removidas dos frascos de cultura por dissociação enzimática por meio do tratamento com EDTA 1 mM (Gibco, EUA) e tripsina 0,25% (Gibco®), sendo posteriormente contadas em microscópio invertido, com auxílio de um hemocítmetro (Thermo Fisher Scientific®). As células foram cultivadas sobre os SCA contidos em placas de 96 poços (Corning®), na densidade de 5×10^4 células/poço, e cultivadas em meio de cultivo D-MEM contendo 10% de SFB, 5 µg/mL de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato, sendo mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO² e 95% de ar atmosférico.

1.2.5.3. Viabilidade celular por MTT

Para checar a viabilidade celular dos OSB cultivados sobre o PhC formado nos SCA com e sem APT foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma®), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). Esse ensaio foi realizado por 72 h, sendo esse o momento ideal para checar a viabilidade celular (BOCCAFOSCHI et al., 2015). Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS (Invitrogen®) foram preparadas e adicionadas ao meio de cultivo com os SCA, ficando numa concentração à 10% por 4 hr a 37 °C, sendo mantida em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PB (Invitrogen®) aquecido. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL desse precipitado foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medição colorimétrica no espectrofotômetro µQuanti (BioTek Instruments, Inc., EUA) no comprimento de onda a 570 nm.

1.2.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia do OSB e do PhC foi acessada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica Multiusuário (LMME) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Inicialmente, o PhC e os OSB cultivados sobre os SCA com e sem APT foram mantidos por 72 h em meio de cultivo, como citado anteriormente. O substrato formado sobre o SCA foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,2 M. Os grupos experimentais investigados foram quatro: SCA+PhC, SCA+APT+PhC, SCA+PhC+OSB e SCA+APT+PhC+OSB. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% e absoluto, Merck Millipore®) e metalizadas com banho de ouro por 120 segundos por Bal-Tec SCD 050 (Baltec, EUA). A aquisição das imagens nos respectivos grupos foi realizada pelo equipamento SEM Jeol JSM -6610 LV (Jeol, JP) com resolução de 5,0 mm a 25kV, WD10mm e ampliação de x15 a x200.000.

1.2.5.5. Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada)

Os OSB cultivados sobre os SCA+PhC e SCA+APT+PhC por 7 e 10 dias foram lavados com solução de Hanks, fixados em etanol a 70 % por 60 min (4 °C) e lavados com PBS e água bidestilada. Em seguida, foram corados com coloração de vermelho de Alizarina (ARS, sigla em inglês) a 2 %, pH 4,2 por 15 min (RT), lavadas com PBS e água bidestilada, e deixadas secar em RT. Morfologicamente, as proporções de áreas marcadas com ARS foram avaliadas pelo programa Leica QWin (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, ALE), por meio da detecção de cor por intensidade, a partir de imagens obtidas no estereomicroscópio Leica MZ6 (Leica®), objetiva de 8X, utilizando a câmera Leica DC300 F (Leica®) de 1,3 MPixel de resolução. Bioquimicamente, os acúmulos de cálcio foram quantificados pelo método de extração da ARS (GREGORY et al. 2004). Em cada poço da placa de 96 poços (Corning®) contendo as amostras coradas com ARS, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10%, sob agitação suave por 30 min. A camada de células removida com um raspador e o SCA foram transferidos juntamente com a solução ácida para tubos de 1,5 mL tipo Eppendorf (Axygen, EUA) e agitada em vortex por 30

s. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85 °C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 13.000 g por 20 min. De cada grupo experimental foram transferidos 100 µL de sobrenadante para uma placa de 96 poços (Corning®) e adicionados 40 µL de hidróxido de amônio a 10% em cada poço. As amostras foram lidas no espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc., EUA), a 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de ARS de 0,5 a 3 mM em acetato de amônio (ácido acético a 10% e hidróxido de amônio a 5 M).

1.2.5.6. Morfologia celular e análise tridimensional de substrato por microscopia confocal

Esta metodologia foi utilizada para verificar a marcação da fosfatase alcalina (ALP) e sialoproteína óssea (IBSP) nos OSB (UMR-106) cultivados sobre SCA+PhC e SCA+APT+PhC, sendo o protocolo adaptado de De Oliveira e Nanci (DE OLIVEIRA & NANCI, 2004). Após 10 dias, os OSB cultivados sobre o substrato foram lavados com PB (Gibco®) e fixados com paraformaldeído a 4% a 0,1 M diluído em PB, pH 7,2, por 10 min, à RT. As células da membrana foram permeabilizadas com solução de Triton x-100 a 0,5% em PB (Gibco®) por 10 min, seguido de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Para detecção da ALP e IBSP, os anticorpos monoclonais primários anti-ALP (coelho, 1:100, Bioss, EUA) e anti-BSP (camundongo, 1:200, DSHB, EUA) foram incubados por 60 minutos em RT. Para detecção dos anticorpos primários foram utilizados os anticorpos secundários anti-coelho Alexa Fluor 594 (1:200, Molecular Probes, EUA) e anti-camundongo Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes®), diluídos em PB, por 50 min à RT. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (Molecular Probes®) a 300 nM por 5 min. Os SCA foram montados entre duas lamínulas de vidro com 24x32mm (Knittel Glass, ALE) usando o meio de montagem anti-fade Vectashield™ (Vector Laboratories, EUA). As amostras foram examinadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifóton (LMMM) da FMRP-USP pelo sistema de imagem de microscopia multifotônica usando o Microscópio Multifóton Zeiss LSM 7MP (Carl Zeiss, ALE), usando uma objetiva W Plan-Apochromatica 10x e 40X /1.0 (Carl Zeiss®) e sistemas a laser Ti: Sapphire Chameleon Vision II (Coherent Inc., EUA). Para a formação de imagens 2D (X e Y) e 3D (X, Y e Z) foram adquiridas 30 imagens em um plano

vertical (eixo z) ao longo de 100 µm de espessura. A quantificação de ALP e BSP em diferentes grupos experimentais foi acessada em imagem 2D pela ferramenta "Straight Lines" do software ImageJ (software de domínio público, desenvolvido por Wayne Rasband (NIMH, NIH, Bethesda, MD, EUA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Em cada grupo foram selecionadas 50 células. Os resultados foram obtidos a partir da intensidade de fluorescência de cada célula.

1.2.5.7. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Após 5 dias do cultivo dos OSB sobre os SCA+PhC e SCA+APT+PhC em uma placa de 24 poços, os SCA foram lavados com solução de PB (Gibco®). Em seguida, 1 mL do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific®) foi adicionado em cada poço por 10 min (RT) para coleta do RNA. Após a adição do TRIzol™, a amostra foi transferida para um tubo de 1,5 mL (Axygen Scientific Inc., EUA), e 200µL de clorofórmio (Merck Millipore®) foram adicionados por 5 min e, sequencialmente, centrifugados à 4°C e 12000g por 15 min. A fase aquosa (superior) foi coletada em novos tubos de 1,5 mL (Axygen Scientific®) e 250µL de etanol 96% (Merck®) foram adicionados para posterior extração e purificação do RNA em colunas de sílica gel do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA). O protocolo de extração total do RNA seguiu as recomendações do fabricante do kit. A concentração e pureza de RNA foram verificadas por espectrofotometria no Espectrofotômetro NanoVue Plus™ (GE Healthcare, EUA).

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total no termociclador Master Cycle Gradient (Eppendorf, ALE) por meio da reação com a enzima transcriptase reversa do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, EUA). O RT-PCR foi realizado usando o sistema TaqMan (Life Technologies®) no aparelho QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems®). A expressão dos genes alvos envolvidos nos processos de diferenciação de osteoblastos foi determinada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A expressão gênica dos marcadores osteoblásticos avaliados foram: Fosfatase Alcalina (*Alpl*, sigla em inglês), Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2 (*Runx2*, sigla em inglês), Osteocalcina (*Bglap*, sigla em inglês), Sialoproteína Óssea (*Ibsp*, sigla em inglês) e Fator de Crescimento Transformador beta 1 (*Tgf-β1*, sigla em inglês)

(Tabela 1). As reações foram realizadas em quadruplicata com volume final de 10 µL por poço na placa MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction (Applied Biosystems®) e uma quantidade de cDNA correspondente a 50 ng de RNA total diluído no reagente TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Aplicado Biosystems®). Como controle endógeno, avaliou-se a estabilidade da expressão da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*, sigla em inglês).

Tabela 1 – Sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) usadas no ensaio de RT-PCR no estudo *ex vivo*.

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Ensaio TaqMan
<i>Runx2</i>	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2	Rn01512298_m1
<i>Alp</i>	Fosfatase alcalina do fígado/osso/rim	Rn01516028_m1
<i>Bsp</i>	Sialoproteína Óssea	Rn00561414_m1
<i>Bglap</i>	Proteína Óssea Contendo Ácido Gama-carboxiglutâmico (Osteocalcina/oc)	Rn00566386_g1
<i>Tgf-β1</i>	Fator de Crescimento Transformador beta	Rn00572010_m1
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase	Rn99999916_s1

1.2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi checada utilizando o teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Para observar as diferenças entre os grupos investigados, foram realizados testes paramétricos *t* de *Student* ou não paramétricos de Mann-Whitney. O nível de significância foi $p < 0,05$ para todos os testes. Os resultados foram expressos textualmente e em gráficos com média ou mediana e desvio padrão (média ± erro padrão) ou desvio interquartilico (mediana ± interquartilico).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. CD90, CD45 e CD44 são mais expressos no PhC formado no SCA com APT

A caracterização das células presentes no PhC foi verificada usando marcadores de superfície de agrupamento de diferenciação (CD, sigla em inglês) para CTM (CD90), leucócitos (CD45), células progenitoras hematopoiéticas (CD34), leucócitos (CD44), plaquetas (CD42) e para fator von Willebrand, endotelial, mielóide e células de osteoclastos (CD61). A população celular selecionada foi semelhante em cada grupo, variando em tamanho e complexidade das células presentes no PhC formadas nos SCA. (Figura 4.A).

O grupo SCA+APT+PhC apresentou elevada marcação para CD90 ($p = 0,0119$; $9,633 \pm 0,6360$), CD45 ($p = 0,0004$; $82,20 \pm 6,605$) e CD44 ($p < 0,0001$; $15,15 \pm 7,283$) quando comparado ao grupo SCA+PhC (CD90 = $3,950 \pm 0,8500$; CD45 = $4,467 \pm 2,805$; CD44 = $6,700 \pm 1,556$) (Figura 4.B). A porcentagem de células para CD90, CD45, CD34, CD44, CD42 e CD61 no grupo SCA+PhC foi de 3,95%, 5,45%, 2,15%, 70%, 8,35% e 3,80%, enquanto no grupo SCA+APT+PhC foi 9,10%, 85,40%, 2,30%, 15,15%, 8,00% e 3,10% (Figura 4.C). A marcação observada para CD34 ($p = 0,9688$; $2,667 \pm 0,4702 / 2,633 \pm 0,6489$), CD42 ($p = 0,9547$; $8,500 \pm 1,550 / 8,350 \pm 1,850$) e CD61 ($p = 0,5862$; $3,8 \pm 0,60,8876$) não teve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

1.3.2. O APT proporcionou a formação de um PhC rico em células brancas sanguíneas

As eletrofotomicrografias adquiridas na MEV permitiram a verificação da morfologia de PhC e dos OSB em SCA funcionalizados ou não com APT (Figura 4.D). No grupo SCA+PhC houve a predominância de células sanguíneas vermelhas (RBC, siglas em inglês), especificamente os eritrócitos/glóbulos vermelhos (cabeça de seta, Figura 4.D.9), enquanto há claramente uma predominância de células sanguíneas brancas (WBC, sigla em inglês) no grupo SCA+APT+PhC (cabeça de seta, Figura 4.D.10). A prevalência de mais leucócitos no PhC formado nos SCA funcionalizados com APT corrobora os achados observados na citometria de fluxo. No grupo SCA+PhC+OSB, algumas células sanguíneas e OSB (seta, Figura 4.D.11) foram observados em uma malha de fibrina densa (cabeça de seta, Figura 4.D.11). Por outro lado, no SCA+APT+PhC+OSB foi observada maior quantidade de células brancas e

esféricas, com o mesmo padrão morfológico, numa malha de fibrina rica em MEC (cabeça de seta, Figura 4.D.12).

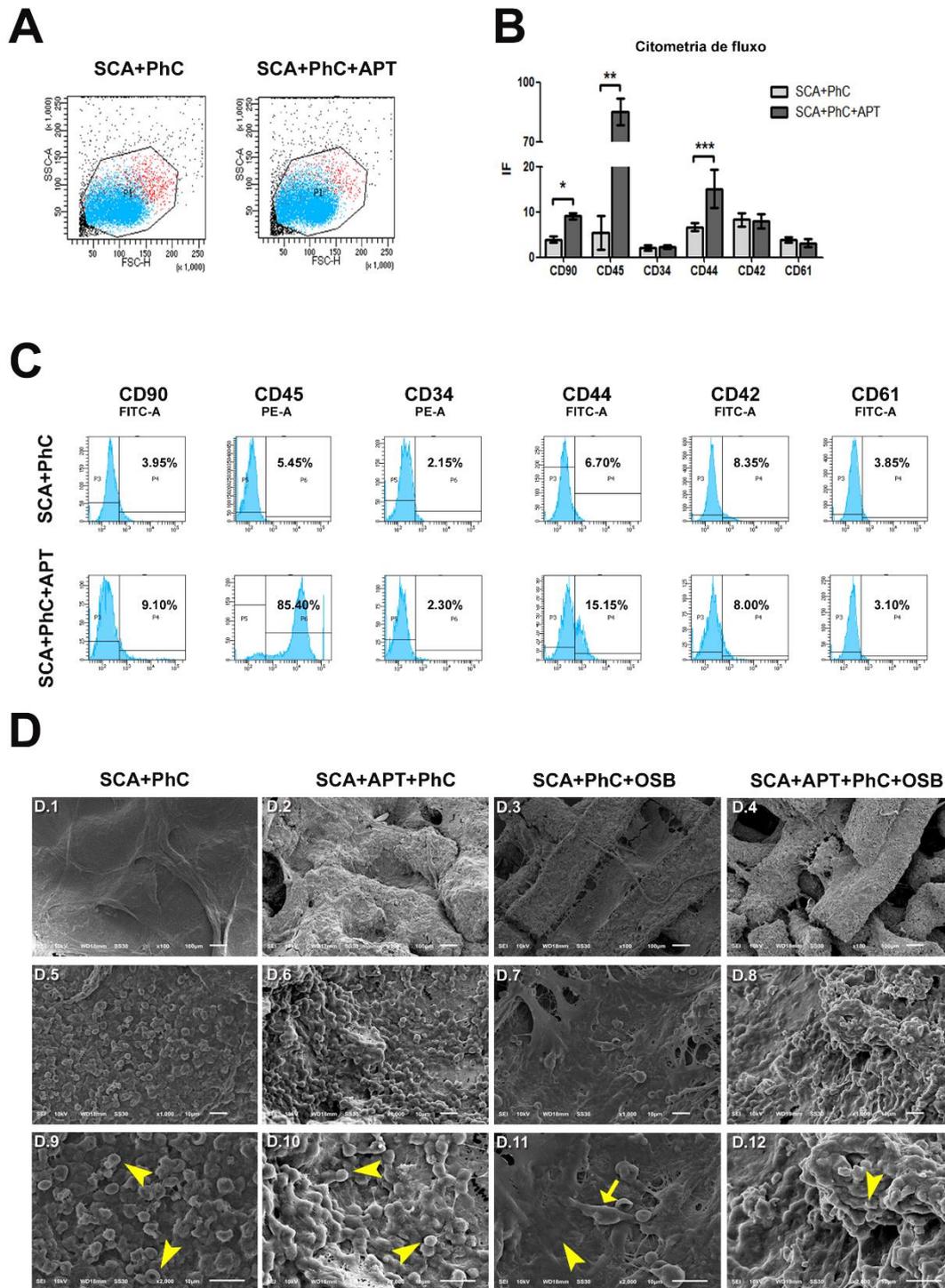


Figura 4. (A) - Dot-plot mostrando as populações celulares detectadas no PhC formado nos grupos experimentais avaliados por citometria de fluxo. A população de células selecionadas no PhC formada sobre os SCA foi semelhante em cada grupo, variando em tamanho e complexidade das células; (B) - Gráfico mostrando maior expressão de CD90 (*), CD45 (**), CD44 (***) em SCA+APT+PhC quando comparado a SCA+PhC; (C) - Histogramas mostrando a média em percentual de células marcadas para CD90, CD45, CD34, CD44, CD42 e CD61 em cada grupo; (D) Eletrofotomicrografias mostrando os grupos SCA+PhC (D.1, D.5, D.9), SCA+APT+PhC (D.2, D.6, D.10), SCA+PhC+OSB (D.3, D.7, D.11) e SCA+APT+PhC+OSB (D.4, D.8, D.12) nos aumentos de 100x (D.1-D.4), 1000X (D.5 - D.8) e 2000x (D.9 - D.12). Cabeça de seta (D.9-D.12) e seta (D.11) mostrando diferentes tipos de células nos PhC formados sobre os SCA. Escala: 10 µm e 100 µm. Valor da significância: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

1.3.3. APT não interfere na viabilidade das células OSB e PhC

A viabilidade do OSB e do PhC após 72 horas de cultivo sobre os SCA com e sem APT não tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos SCA+PhC+OSB ($p = 0,7992$; $1,153 \pm 0,2241$) e SCA+APT+PhC+OSB ($1,249 \pm 0,2867$) (Figura 5.A) - APT não interferiu negativamente na viabilidade celular.

1.3.4. Expressão gênica do TGF- β 1 foi elevada no grupo APT

O gene *Tgf- β 1* foi mais expresso no grupo SCA+APT+PhC+OSB ($p = 0,0265$; $6,835 \pm 5,328$) quando comparado ao grupo SCA+PhC+OSB ($1,019 \pm 0,03734$) (Figura 5.B). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão dos genes para *Alpl* ($p = 0,6318$; $1,365 \pm 0,4888 / 0,9458 \pm 0,6715$), *Runx2* ($p = 0,6470$; $1,045 \pm 0,3387 / 0,8037 \pm 0,3699$), *Bglap* ($p = 0,8198$; $0,2673 \pm 0,2448 / 0,1931 \pm 0,193$) e *Ibsp* ($p = 0,9615$; $0,7958 \pm 0,1118 / 0,8330 \pm 0,6154$).

1.3.5. O APT não interferiu na formação da matriz mineralizada

A formação de depósitos de matriz mineralizada nos OSB em diferentes substratos foi avaliada após 7 e 10 dias de ensaio *ex vivo*. Nesses períodos experimentais (Figura 5.C e 5.D) não houveram diferenças estatisticamente significativas entre SCA+PhC+OSB (7 dias - $p = 0,4627$; $0,6397 \pm 0,08218$ / 10 dias - $p = 0,7633$; $0,5620 \pm 0,07755$) e SCA+APT+PhC+OSB (7 dias - $0,7093 \pm 0,02488$ / 10 dias - $0,5367 \pm 0,01273$) – o APT não melhorou os padrões de mineralização.

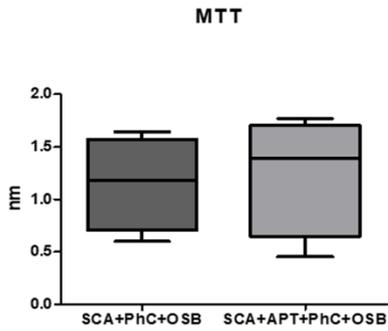
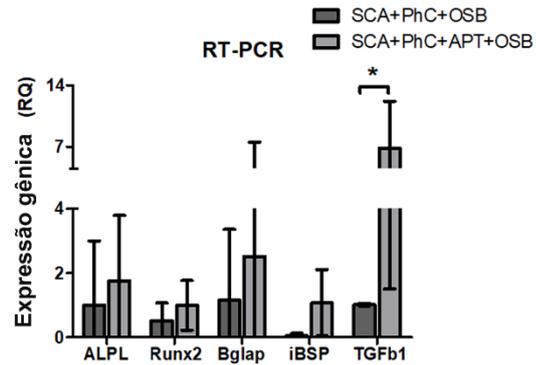
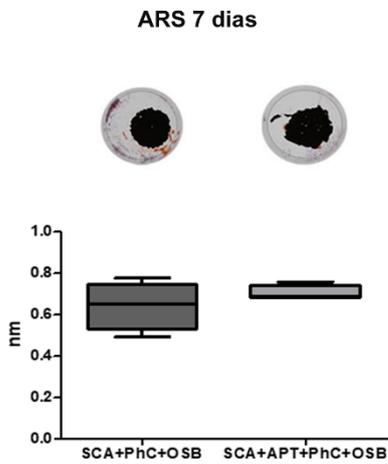
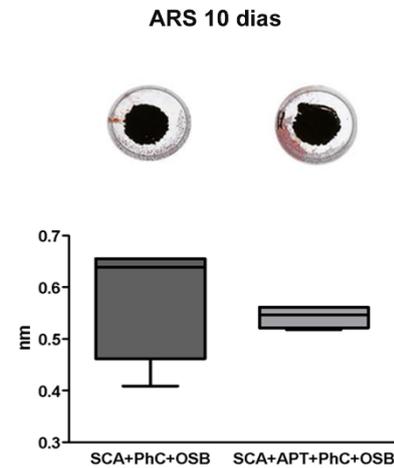
A**B****C****D**

Figura 5. (A) – Resultados do ensaio de MTT; (B) – Gráficos mostrando os resultados de RT-PCR, evidenciando diferença na expressão gênica do *Tgf-β1* (*) entre os grupos investigados; (C) – Ensaio de mineralização em 7 dias; (D) – Ensaio de mineralização em 10 dias. Valor da significância: * p < 0.05.

1.3.6. A imunomarcção da ALP e da IBSP foi elevada no grupo APT

A microscopia multifóton forneceu imagens 2D e 3D do substrato formado no SCA (Figura 6) após 10 dias de cultura de células OSB. Morfologicamente (Figura 6.A e 6.B) e tridimensionalmente (Figura 6.C), o grupo APT apresentou maior densidade celular e mais fluorescência dos marcadores osteoblásticos em relação ao grupo sem APT (Figura 6.G - 6.I). A ALP apresentou aspecto granulomatoso em ambos os grupos (Figura 6.E e 6.K). No grupo

SCA+APT+PhC+OSB, a marcação foi mais intensa, permitindo claramente a identificação da morfologia celular e a localização dos OSB sobre os SCA. A imunopressão da IBSP em ambos os grupos (Figuras 6.F e 6.L) foi menos intensa quando comparada à ALP, se apresentando de forma dispersa e irregularmente distribuída sobre o SCA, com alguns pontos específicos de intensidade.

Quantitativamente, o APT proporcionou maior imunomarcção da ALP ($p < 0,0001$; $151,6 \pm 5,124$) (Figura 6.M) e da IBSP ($p = 0,0002$; $38,43 \pm 4,289$) (Figura 6.N) nos OSB quando comparado ao grupo SCA+PhC+OSB (ALP = $80,70 \pm 7,550$; BSP = $18,17 \pm 2.530$).

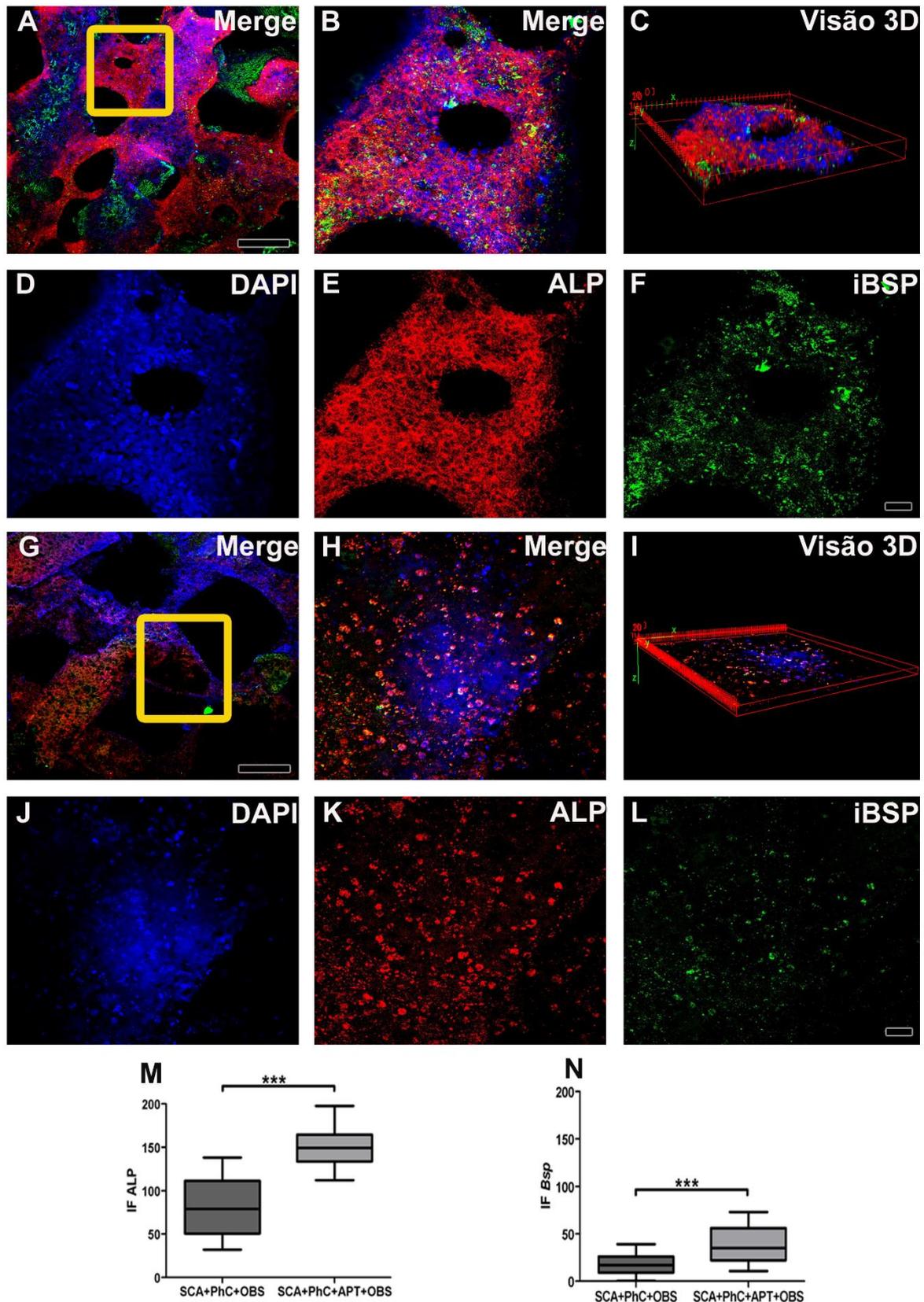


Figura 6. Imagens de imunofluorescência obtidas em microscopia multifóton nas objetivas de 5x (A e G) e 20x (B e H) mostrando a morfologia dos OSB sobre o PhC formado em SCA funcionalizado (A-F) e não funcionalizado (G-L) com APT. Imagens 3D dos OSB sobre o PhC formado nos SCA com (C) e sem APT (I), ilustrando mais densidade dos OSB no grupo com APT. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (D e J), ALP com Alexa Fluor 594 (E e K) e IBSP com Alexa Fluor 488 (F e L). A imunoe expressão da ALP (M) e IBSP (N) no grupo SCA+APT+PhC+OSB foi maior quando comparado ao grupo SCA+PhC+OSB. Escala: 20 μ m e 50 μ m e. Valor da significância: *** $p < 0,001$.

1.4. DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foi verificado o efeito de SCA 3D funcionalizados com APT anti-FN na formação do coágulo sanguíneo e, adicionalmente, na osteogênese. Os resultados mostraram que o APT levou à melhora nos padrões de coagulação, exibindo maior expressão de CTM (CD90), linfócitos (CD45) e leucócitos (CD44). Os achados da MEV revelaram evidente predominância de células sanguíneas brancas em uma malha de fibrina enriquecida com uma MEC. Além disso, a funcionalização do SCA resultou na elevada marcação da ALP, IBSP e do gene *Tgf-β1* nos OSB cultivados sobre o PhC.

O uso do SCA à base de quitosana nesta investigação foi realizado por se tratar de um biomaterial altamente hidrofílico, com excelentes propriedades biológicas (PEPPAS et al., 2000) para a elaboração de SCA 3D direcionados à regeneração óssea (SU et al., 2014; MAJI et al., 2016; PARISI et al., 2017). Nesse contexto, a funcionalização de biomateriais 3D tem sido proposta, visando a absorção de moléculas específicas na superfície, na tentativa de modificar sua bioatividade e fisiologia (RANA et al., 2017). Inspirados no hematoma criado durante a cicatrização tecidual, a biomimética envolvendo hidrogéis voltados para a engenharia tecidual atraem interesses significativos no desenvolvimento de biomaterial ósseo funcional (YANG & XIAO, 2020).

Aqui, a funcionalização com APT anti-FN foi proposta pois essa glicoproteína está amplamente disponível no plasma sanguíneo, auxiliando especialmente na agregação plaquetária e na fibrinogênese (WANG & NI, 2016; XU et al., 2016). Por outro lado, a FN irá reforçar a formação da malha de fibrina que servirá como suporte para o recrutamento de células progenitoras (SCHULTZ et al., 2009). Além disso, essa importante proteína da MEC é indispensável em muitos processos fisiológicos (CHATAKUN et al., 2014; HALPER & KJAER, 2014), sendo conhecida por participar dos estágios iniciais da osteogênese (RAHMAN et al., 2005; FAIA-TORRES et al., 2015).

Em estudos voltados para regeneração e biomateriais, o ensaio de MTT é utilizado exclusivamente para verificar a toxicidade de determinados biomateriais sobre as células investigadas (RISS et al., 2016). A quitosana apresenta boa compatibilidade, pH ideal e excelente contratibilidade para que as células sanguíneas venham a aderir adequadamente ao material (HOEMANN et al., 2017). Conforme observado neste estudo, o SCA tornou o microambiente

propício à viabilidade celular tanto do PhC quanto dos OSB. Portanto, a adsorção de APT ao SCA não gerou toxicidade ao biomaterial.

A utilização do coágulo sanguíneo formado em modelo animal permitiu a formação do PhC. Este método permitiu o orquestramento simultâneo da resposta imune juntamente com a cascata de coagulação do hospedeiro. Existem modelos *ex vivo* de formação do coágulo, onde o sangue é coletado e imediatamente adicionado ao SCA (FAM et al., 2021). No entanto, os eventos celulares associados à coagulação que acontece *in vivo* acabam sendo negligenciados. Neste estudo, o PhC foi criado em defeitos de calvária de ratos, propiciando o recrutamento de células progenitoras, de células imunes e a liberação inicial de fatores de crescimento relacionados. Na sequência, esse construto foi transportado para análise. Com isso, buscou-se investigar como o processo associado à formação do coágulo mimetiza um microambiente pró-reparativo.

Observou-se que o APT induziu a prevalência de CTM (CD90) no PhC. As CTM podem se diferenciar em tipos celulares específicos (BEERAVOLU et al., 2017) e levar à secreção de várias citocinas e quimiocinas que contribuem para a diferenciação dos OSB (HOCKING & GIBRAN, 2010). Essa sinalização parácrina pode influenciar células residentes, promovendo efeitos imunomoduladores (KIM et al., 2013), anti-apoptóticos e antioxidantes (KIM et al., 2018). Assim, a detecção expressiva de CTM no PhC formado nos SCA com APT pode, além de recrutar tipos celulares associados ao reparo tecidual, potencializar a liberação de GF substanciais para osteoimunologia.

Outro fator visto na citometria foi também a predominância de linfócitos (CD45) e leucócitos (CD44) no PhC sobre o SCA com APT. A CD45 é uma proteína receptora da tirosina fosfatase, um regulador essencial das células T e B, protagonistas na mediação do sistema imune inato (RHEINLÄNDER et al., 2018). A CD44 é uma glicosaminoglicana que participa das interações celulares com a MEC, dentre elas a adesão, motilidade e proliferação (RAZINIA et al., 2017). Os leucócitos são células normalmente presentes na rede de fibrina, sendo uma fonte significativa de citocinas e GF, podendo atuar sinergicamente com as plaquetas presentes no coágulo sanguíneo (PONTA et al., 2003). Além disso, alguns estudos relatam o papel da CD44 na rigidez da MEC (RAZINIA et

al., 2017). Em conjunto com vários tipos de células, incluindo as CTM e os linfócitos, os leucócitos participam do processo de cicatrização.

Os resultados da MEV corroboraram com os achados da CF. A morfologia do PhC formado no SCA com APT mostrou um coágulo enriquecido com uma malha de fibrina composta principalmente por diferentes tipos celulares. Como visto na imagem 3D na microscopia multifóton, o mesmo grupo evidenciou mais OSB sobre o PhC. Isso possivelmente criará um microambiente celular propício à expressão de genes associados à osteogênese, dentre eles o *Tgf-β1*.

A funcionalização com APT resultou em maior expressão do gene *Tgf-β1*, como observado no RT-PCR. O *Tgf-β1* é um polipeptídeo quimiotático voltado para o recrutamento de macrófagos e fibroblastos (CHEGINI, 2010), além de possuir alta afinidade com proteínas da MEC, como a FN (ROBERTSON et al., 2015). Essa relação *Tgf-β1*/MEC influencia diretamente na diferenciação celular (WU et al., 2016), sendo isso imprescindível nas vias de sinalização da osteogênese (ELSAFADI et al., 2019). Além disso, células que estão normalmente presentes na rede de fibrina, como os leucócitos e as plaquetas, são riquíssimas fontes de GF (GRAINGER et al., 2000). Assim, o *Tgf-β1* foi mais expresso no PhC formado sobre o SCA com APT, podendo proporcionar a liberação deste GF pelos leucócitos e plaquetas presentes na rede de fibrina, atuando diretamente na deposição de MEC e na osteodiferenciação.

ALP é fundamentalmente conhecida como um ativador da diferenciação dos OSB, iniciando o mecanismo de mineralização da MEC (VIMALRAJ, 2020). Essa metaloenzima é facilmente encontrada na superfície celular e na matriz vesicular de alguns tecidos (SILLER & WHYTE, 2018). Quando ativada, induzirá a deposição da hidroxiapatita (HA) por vesículas que atravessam a membrana celular, liberando a HA na MEC (GOLUB & BOESZE-BATTAGLIA, 2007). A adesão da HA ao colágeno e sua maturação será intermediada por proteínas presentes na MEC, como a IBSP. Esta fosfoproteína aniônica irá mediar o comportamento dos OSB e consolidar a deposição da matriz mineralizada ao colágeno (HOLM et al., 2015). A imunofluorescência realizada nesta pesquisa mostrou maior imunomarcagem da ALP e da IBSP no grupo APT.

Por outro lado, ao analisar a formação da matriz mineralizada por ARS, em 7 e 10 dias, não houve diferença entre os grupos. Uma explicação para esse fato é que, possivelmente, as células do PhC entraram em competição com os

OSB, retardando a deposição de minerais que poderiam ser vistos em um período posterior a 10 dias.

Apesar das limitações desta pesquisa, é possível inferir que o enriquecimento de SCA 3D com APT anti-FN modifica os padrões de coagulação, favorecendo o comportamento osteoblástico em ensaios *ex vivo* amplificando efeitos positivos na osteodiferenciação. A adsorção de APT anti-FN em biomateriais 3D apresenta características promissoras para osteoimunomodulação e microambiente pró-inflamatórios.

1.5. CONCLUSÕES

- O ensaio *ex vivo*, a partir da formação do coágulo fisiológico em defeito crítico criado em calvária de ratos, apresenta-se como alternativa interessante para tornar os resultados em linhagens celulares osteoblásticas mais próximo dos que acontecem em estudos *in vivo*;
- O APT funcionalizado nos SCA 3D melhora o padrão de coagulação, levando a formação de uma densa rede de fibrina enriquecida com células progenitoras e imunoinflamatórias;
- O PhC formado sobre os SCA funcionalizados com APT provoca elevada detecção da ALP, da IBSP e do TGF-1 β , podendo favorecer a osteodiferenciação dos OSB.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2: PERFIL TRANSCRIPTÔMICO E ONTOLÓGICO DESENCADEADO POR SCA 3D FUNCIONALIZADOS COM APTÂMEROS ANTI-FIBRONECTINA NA OSTEIMUNOLOGIA.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar, *in vitro*, a atuação de SCA 3D enriquecido com APT anti-FN nos eventos celulares e na diferenciação osteoblástica;
- Verificar *in vivo* os eventos iniciais associados à formação óssea e o perfil transcriptômico desencadeado por SCA 3D funcionalizados com APT anti-FN.

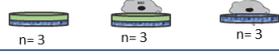
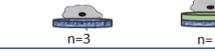
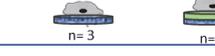
2.1. MATERIAL E MÉTODOS

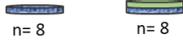
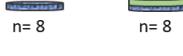
2.1.1. Confecção do APT e dos SCA 3D

O APT e o SCA utilizados para o desenvolvimento deste capítulo foram obtidos como descrito anteriormente no item 1.2.1.

2.1.2. Funcionalização dos SCA com APT

Essa etapa seguiu o protocolo como previamente descrito no item 1.2.2. Os ensaios realizados neste capítulo foram *in vitro* e *in vivo* (Figura 7).

Ensaio in vitro	Métodos	Grupos
	MTT	
	MEV	
	Ensaio de mineralização	
	Microscopia confocal	

Ensaio in vivo	Períodos	Grupos	Métodos
	5 dias	 n= 8  n= 8	Micro-CT Morfometria Imunofluorescência RNA-Seq RT-PCR
	15 dias	 n= 8  n= 8	

Legenda das figuras:



Figura 7. Delineamento experimental das análises desenvolvidas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* no capítulo 2.

2.1.3. Ensaio *In vitro*

2.1.3.1. Cultivo dos OSB sobre os SCA

Após atingir confluência em torno de 80% nas garrafas de cultivo celular, as células foram removidas dos frascos de cultura por dissociação enzimática por meio do tratamento com EDTA 1 mM (Gibco®) e tripsina 0,25% (Gibco®), sendo posteriormente contadas em microscópio invertido, com auxílio de um hemocítmetro (Thermo Fisher Scientific®). As células foram cultivadas sobre os SCA funcionalizados ou não com APT localizados em placas de 96 poços (Corning®), na densidade de 5×10^4 células/poço, e cultivadas em meio de cultivo D-MEM contendo 10% de SFB, 5 µg/mL de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato, sendo mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO² e 95% de ar atmosférico.

2.1.3.2. Viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular dos OSB cultivados sobre os SCA com e sem APT foi verificada pelo ensaio colorimétrico MTT, como descrito no item 1.2.5. do capítulo 1.

2.1.3.3. MEV

A morfologia do SCA e dos OSB foi explorada por MEV no LMME da FMRP-USP, seguindo o protocolo descrito no item 1.2.6. desta tese. Os grupos experimentais investigados foram dois: SCA+OSB e SCA+APT+OSB.

2.1.3.4. Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada)

Os OSB cultivados sobre os SCA e SCA+APT por 7 e 10 dias foram analisados usando o mesmo procedimento laboratorial descrito no item 1.2.7.

2.1.3.5. Imunofluorescência da ALP e IBSP em microscopia confocal

Esta metodologia foi utilizada para verificar a marcação da ALP e IBSP nos OSB (UMR-106) cultivados sobre SCA+PhC e SCA+APT+PhC, sendo o método utilizado exatamente igual ao detalhado no item 1.2.8. Imagens 2D foram adquiridas a partir de 30 imagens adquiridas em um plano vertical ao longo de 100 µm de espessura. A quantificação de ALP e IBSP foi realizada pelo software ImageJ (NIMH, EUA). Em cada grupo foram selecionadas 50 células. Os resultados foram obtidos a partir da intensidade de fluorescência de cada célula.

2.1.4. Ensaio *In vivo*

2.1.4.1. Delineamento experimental

Com o objetivo de associar os ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi verificado o efeito da funcionalização dos SCA com APT aos eventos iniciais associados à formação óssea em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Nesta etapa, foram utilizados 32 ratos Hannover, machos, com idade de 12 semanas, adquiridos no Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto.

O cálculo de tamanho amostral foi realizado pelo programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software®). O tamanho amostral ideal utilizado para

assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado considerando as diferenças das médias e desvio-padrão, sendo o valor de α ajustado em 0,05, tendo como referência o estudo de MESSORA et al. 2008. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, sendo 4 ratos por caixa. Durante o período de alojamento, os animais foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*, permanecendo em uma temperatura de 25°C, em 12 h de ciclo escuro/claro.

Esse experimento foi realizado em dois tempos experimentais, 5 e 15 dias, sendo os grupos divididos da seguinte forma: 1) SCA 5, 2) SCA+APT 5, 3) SCA 15 e 4) SCA+APT 15, sendo o tamanho amostral de 8 animais (n=8) por grupo.

2.1.4.2. Procedimento cirúrgico

O protocolo experimental foi realizado no Biotério da FORP - USP, seguindo o passo a passo do procedimento descrito por Pinto-Engler e colaboradores (PINTO-ENGLER et al., 2018). Inicialmente, os animais foram anestesiados com Xilazina (10mg/Kg, Syntec®) e Ketamina (80mg/Kg, Syntec®), via IM. Após atingirem plano anestésico profundo, o animal foi posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica. Em seguida, foi feita tricotomia na derme adjacente ao crânio, seguida de antissepsia com PVPI e incisão semilunar com bisturi 15C (Solidor®), sendo o retalho de espessura total rebatido, junto com o perióstio adjacente à derme, em direção posterior. Após isso, para a criação do defeito ósseo foi utilizado o motor elétrico BLM 500, VK (Driller®), com um contra-ângulo redutor 16:1 com velocidade a 800rpm, utilizando broca trefina com 5 mm de diâmetro (Quinelato®) e irrigação abundante com solução salina estéril. Durante a cirurgia, o segmento ósseo foi removido delicadamente com descolador Molt 2-4 (Hu-Friedy®), objetivando manter a dura-máter íntegra. Com auxílio da sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (Hu-Friedy®) foram criadas marcações 2mm anterior e 2mm posterior às margens do defeito cirúrgico com uma broca esférica diamantada 1014 (KG Sorensen, BRA) acoplada à um motor de alta rotação. Essas marcações foram preenchidas com amálgama para identificar o meio do defeito e localizar a posição das margens ósseas originais no momento da morfometria. Em seguida, os SCA com 5 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram posicionados nos defeitos criados

bilateralmente, sendo um lado direcionado à Micro-Tomografia Computadorizada (Micro-CT) e processamento histológico, e o outro para análise transcriptômica.

Por fim, a incisão foi suturada com fio Nylon 4.0 (Ethicon®). Após a cirurgia, o animal recebeu o analgésico cloridrato de tramadol Cronidor™ (2 mg/kg, Agener União®), via subcutânea, sendo acompanhado até o retorno dos seus reflexos córneos. Passados os períodos de 5 e 15 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica de Lidocaína (0,7mg/Kg) associada ao Tiopentato de sódio 2,5% (150 mg/kg) para retirada das peças. As amostras direcionadas para o Micro-CT e processamento histológico foram acondicionadas individualmente em potes plásticos devidamente identificados contendo formol (Merck Millipore®) neutro tamponado diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS, sigla em inglês, Merck Millipore®) à 4%. As amostras para a análise transcriptômica foram armazenadas em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL (Axygen®) e mantidas à - 80°C.

2.1.4.3. Análise em Micro-CT

Após fixação em formol neutro por 48 horas, as amostras foram analisadas pelo microtomógrafo cone-beam SkyScan 1174v2 (SkyScan N.V., BEG), gerando imagens 3D de cada amostra. Na aquisição das imagens notou-se uma resolução espacial de 10 µm, com o gerador de raio-X operando com um potencial de aceleração de 60 kV e corrente de 165 µA. Usando o software Data Viewer v.1.5 (SkyScan®), a imagem gerada foi rotacionada para uma posição padrão de análise, sendo determinada a região óssea de interesse (ROI) e o volume ósseo de interesse (VOI). O ROI foi de 5 mm (correspondente ao diâmetro do defeito criado) e VOI de 0,5 x 5 x 5 mm. Para avaliar o tecido ósseo trabecular foi utilizada escala de cinza de 0 a 255, com intervalos threshold de 50 (mínimo) e 130 (máximo) para avaliação do tecido ósseo trabecular presente, e de 130 (mínimo) e 255 (máximo) para avaliar o biomaterial presente.

Com o software CT-Analyser® v.1.13.5.1 (Bruker, BEG), o volume ósseo (BV, sigla em inglês) e o volume total (TV, sigla em inglês) foram quantificados em todas as amostras, além das medições lineares e de área para quantificar o

osso neoformado a partir do VOI. Outros parâmetros também foram determinados na análise volumétrica: a) Porosidade Óssea (PO tot): percentual de porosidades presentes no tecido ósseo; b) Espaçamento de trabéculas (TB.TH): espessura entre as trabéculas ósseas e c) Padrão trabecular (TB.PF): fator padrão de trabéculas ósseas, mostrando se são mais esponjosas. As reconstruções renderizadas das seções microtomográficas das calvárias também foram obtidas.

2.1.4.4. Processamento histológico

Após verificação da microarquitetura óssea, as amostras foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) à 18% (Thermo Fisher Scientific®) por 30 dias para serem submetidas ao processamento histológico para a morfometria e imunofluorescência indireta de dupla marcação. Após a descalcificação, as amostras foram cortadas longitudinalmente, tendo como referência as marcações de amálgama criadas no procedimento cirúrgico, demonstrando exatamente o centro do defeito. As peças foram incluídas em Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, EUA) e cortes longitudinais seriados com 8µm de espessura da calvária foram obtidas no criostato CM1520 EM-SBC (Leica Microsystems, ALE), equipado com uma lâmina de tungstênio (Leica Microsystems®). Os cortes foram montados em lâminas de vidro silanizadas 25 mm x 75 mm StarFrost (Knittel Glass, ALE)

2.1.4.5. Morfometria utilizando coloração Tricrômio de Masson

Para quantificar a matriz óssea e as fibras colágenas formadas nos grupos experimentais, cortes histológicos com 8 µm de espessura foram corados com Hematoxilina de Harris (Sigma®) e Tricrômio de Masson, sendo montados com lamínulas utilizando o meio de montagem Permount™ (Thermo Fisher Scientific, EUA). Posteriormente, 1 imagem em campo claro de cada corte histológico foram adquiridas no microscópio trinocular Leica DMLB (Leica Microsystems®) equipado com a câmera DFC300FX (Leica Microsystems®), com a objetiva de 1,6x. Em cada imagem foi delimitada a área total (AT) analisada, correspondendo a região onde o defeito foi criado, utilizando a ferramenta “Freehand selection” do software ImageJ (NIMH®). Com a mesma ferramenta

foi selecionada a matriz óssea e colagenosa formada nessa AT. A AT foi considerada como 100% da área analisada, enquanto o osso e o colágeno quantificado equivalem a um valor percentual da AT. Os dados obtidos foram em medida de área (μm) da região selecionada.

2.1.4.6. Imunofluorescência de dupla marcação

1 corte histológico de cada amostra criopreservada em Tissue-Tek O.C.T (Sakura®) foram utilizadas para a imunodeteção da ALPL e do RUNX2. A técnica realizada foi a da imunofluorescência indireta de dupla marcação, de acordo com adaptações do estudo de De Oliveira e Nanci (DE OLIVEIRA & NANCI, 2005). Inicialmente, as lâminas foram deixadas em RT por 10 min, seguido pelo bloqueio das ligações inespecíficas dos anticorpos com albumina de soro bovino (BSA, sigla em inglês, Sigma®) a 2% em PBS por 30 min. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-RUNX2 (1:200, mouse, Abcam®) e anti-ALPL a (1:200, rabbit, Abcam®), por 17 hr (“overnight”). Para detecção dos anticorpos primários foram incubados os anticorpos secundários anti-rabbit Alexa Fluor™ 594 (1:350, Thermo Fisher Scientific®) e anti-mouse Alexa Fluor™ 488 (1:350, Thermo Fisher Scientific®), por 2 horas e diluídos em PBS. A montagem das lâminas com lamínulas foi realizada utilizando Fluoromount™ (Sigma®).

2.1.4.7. Avaliação da imunomarcação

Imagens de imunofluorescência de pelo menos 5 áreas selecionadas aleatoriamente de cada amostra foram adquiridas no microscópio Apotome (Carl Zeiss®), equipado com uma câmera CCD a cores AxioCam HRC (Carl Zeiss®), objetiva de 20x. Para quantificar a imunomarcação da ALPL e RUNX2 no tecido formado foi utilizada a ferramenta “Free Hands Selection” do Image J (National Institutes of Health®). Os resultados foram dados em medida (μm^2) e fração de área (%) marcada por cada região selecionada na imagem, de acordo com cada antígeno investigado.

2.1.4.8. Análise transcriptômica por RNAseq

As interações e funções genômicas desencadeadas pela associação do SCA com e sem APT em 5 e 15 na osteogênese foi caracterizada por análise transcriptômica utilizando o sequenciamento de RNA em larga escala denominado RNAseq (MORTAZAVI et al., 2008). A vantagem dessa metodologia permitiu a análise da interação gênica e das redes funcionais envolvidas em diferentes vias específicas de sinalização em um único experimento.

A calvária direcionada para esse experimento foi inicialmente lavada com PBS para remover o sangue presente na amostra. Com um punch (Quinelato®) de 5 mm foi removido o tecido ósseo formado junto com o biomaterial inserido no defeito criado. Após a retirada, as calvárias foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, maceradas com auxílio de cadinho, pistilo e iniciada a extração do RNA total com 1 mL do reagente TRIzol™ (Life Technologies®). No tecido macerado juntamente com o TRIzol™ foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck Millipore®) por 5min à 4°C. Essa solução com a amostra foi adicionada em um tubo de 1,5 mL (Axygen®) para ser centrifugada a 4°C e 12000g, por 15min, e coleta da fase aquosa (superior). Em seguida, foram adicionados 250µL de etanol 96% (Merck Millipore®) e iniciada a purificação do RNA em colunas de sílica gel presentes no kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA purificado foram verificadas por espectrofotometria no aparelho NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare®). O controle de qualidade (QC, sigla em inglês) do RNA foi determinado por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies, USA) e os chips de RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies®), levando em consideração o valor da integridade do RNA (RIN, sigla em inglês) maior ou igual a 8. Foram utilizadas 4 amostras por grupo.

A partir do RNA mensageiro (RNAm) foi confeccionada a fita de cDNA utilizando hexâmeros randômicos e a enzima Superscript II (Invitrogen®). A fita de RNA que gerou a primeira fita de cDNA foi removida e sintetizada uma segunda fita de cDNA. A dupla fita de cDNA criada foi purificada por esferas paramagnéticas AMPure XP beads (Beckman Coulter, EUA), selecionando fragmentos com 150 ≈ 200 pares de bases (bp, sigla em inglês) de comprimento.

A partir disso, múltiplos adaptadores foram ligados às extremidades do cDNA pela ação da enzima ligase e tampões apropriados contidos no kit TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation (Illumina Inc, EUA). Nesse cDNA foi realizado RT-PCR e preparada a biblioteca. Com a biblioteca pronta, o tamanho dos fragmentos foi avaliado utilizando o equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies®). A concentração dos fragmentos formados na biblioteca foi quantificada por meio do fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies®).

Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas e 1,8 pM de cada amostra foi usada para desnaturação e clusterização. Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA foi incorporado à superfície de uma “flow cell” (suporte sólido), dando origem aos clusters – grupos ou colônias de fragmentos ligados à “flow cell”. Nesse momento, a biblioteca estava pronta para o sequenciamento baseado na tecnologia Solexa ou SBS (“Sequencing-by-Synthesis”) (ERLICH et al., 2008), permitindo leitura massiva e paralela (simultânea) da sequência de nucleotídeos de milhões de fragmentos de cDNA capturadas das regiões codificadas. O sequenciamento foi realizado na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina Inc.®) utilizando o Kit NovaSeq 6000 S4 v1.5 (Illumina Inc.®), sendo realizados 20 milhões (M) de leituras por amostra. O arquivo de dados original (FASTQ(fq))(COCK et al., 2010), que contém sequências de leituras e a qualidade das bases correspondente, foi transformado em leituras sequenciadas (“Raw Reads”) pelo reconhecimento de base CASAVA, gerando aproximadamente 6 gigabites (GB) de “raw reads”. O sequenciamento do RNA e a bioinformática foram realizados pela empresa NOVOGENE (Tianjin, China).

2.1.4.9. Bioinformática

A bioinformática foi baseada em amostras puras e íntegras, com RIN ≥ 8 . O nível de expressão gênica foi detectado em fragmentos por quilobase de sequência de transcrição por milhões de pares de bases sequenciadas (FPKM, sigla em inglês). A correlação dos níveis de expressão gênica entre as amostras foi verificada pelo coeficiente de correlação de Pearson (R2). O mapeamento do gene de referência foi realizado com o software STAR v2.5 (DOBIN et al., 2013). Os genes diferencialmente expressos (DEGs, sigla em inglês) foram

identificados usando o pacote DESeq2 R (ANDERS et al., 2010), sendo a expressão gênica normalizada usando DESeq2 v2_1.6.3. O threshold definido foi $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ e valor de $q < 0,005$. O valor de p ajustado $< 0,05$ ($p_{adj} < 0,05$) encontrado por DESeq2 foram atribuídos aos DEGs. Para a ontologia gênica (GO, siglas em inglês; <http://www.geneontology.org>) o ClusterPro filer v2.4.3 (YU et al., 2012) foi empregado para realizar análises de enriquecimento genômico. Os termos GO com valor $p < 0,05$ foram considerados significativamente enriquecidos pelos DEGs. A análise de agrupamento hierárquico foi efetuada pelo $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ dos DEGs nas comparações realizadas.

2.1.4.10. Validação do RNAseq e da ontologia por RT-PCR

O mesmo RNA utilizado para o RNAseq foi direcionado para análise de RT-PCR. O cDNA foi sintetizado pela enzima transcriptase reversa do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®). As reações de RT-PCR foram realizadas usando sistemas TaqMan (Life Technologies®) no aparelho QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems®), usando o método 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os genes usados para a osteogênese e validação de RNAseq estão descritos em detalhes na Tabela 2. As reações foram realizadas em placa MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction (Applied Biosystems®) usando o reagente TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems®). Como controle endógeno, avaliou-se a estabilidade da expressão da *Gapdh*.

Tabela 2 - Sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) utilizadas no RT-PCR para validação dos genes do RNAseq e associados à diferenciação osteoblástica.

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Ensaio TaqMan (código)
<i>Runx2</i>	Fator de Transcrição Relacionado a Runt 2	Rn01512298_m1
<i>Alp</i>	Fosfatase Alcalina Fígado/Osso/rim	Rn01516028_m1
<i>Bsp</i>	Sialoproteína Óssea	Rn00561414_m1

<i>Bglap</i>	Proteína Óssea Contendo Ácido Gama-Carboxiglutâmico (Osteocalcina/Oc)	Rn00566386_g1
<i>Psme2</i>	Complexo ativador do proteossoma - subunidade 2	Rn00820862_g1
<i>Clcn4</i>	Canais de cloreto dependentes de voltagem 4	Rn00573498_m1
<i>Tnf</i>	Fator de Necrose Tumoral	Rn01025859_g1
<i>Vim</i>	Vimentina	Rn00579738_m1
<i>Il-1β</i>	Interleucina 1 Beta	Rn00676333_g1
<i>Krtap7-1</i>	Queratina Associada à Proteína 7-1	Rn03810292_s1
<i>Cd24</i>	Agrupamento de diferenciação 24	Rn00562598_m1
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase	Rn99999916_s1

2.1.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software®), como descrito no item 1.2.6. do Capítulo 1.

2.2. Resultados

2.2.1. Ensaios *in vitro*

2.2.1.1. O APT não interferiu na morfologia dos OSB

As eletrofotomicrografias adquiridas na MEV permitiram a verificação da morfologia de OSB em SCA sem (Figura 8.A-8.C) e com APT (Figura 8.D-8.F). A presença do APT não interferiu na morfologia e na densidade das células OSB presentes na superfície dos SCA.

2.2.1.2. O APT não interfere na viabilidade das células OSB

A viabilidade celular dos OSB após 72 horas de cultivo sobre os SCA com e sem APT não teve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos SCA+OSB ($p = 0,6685$; $0,3718 \pm 0,1615$) e SCA+APT+OSB ($0,4285 \pm 0,1937$) (Figura 8.G) – O APT não interferiu negativamente na viabilidade celular dos OSB.

2.2.1.3. O APT promoveu mais deposição de matriz mineralizada em 10 dias

A formação de depósitos de matriz mineralizada nos OSB cultivados em diferentes grupos após 7 e 10 dias. Em 7 dias (Figura 8.H) não houve diferença entre SCA+OSB ($p = 0,1874$; $0,7007 \pm 0,05574$) e SCA+APT+OSB ($0,8337 \pm 0,06250$). Em 10 dias (Figura 8.I), no grupo APT os OSB apresentaram mais deposição de matriz mineralizada ($p = 0,0263$; $0,8350 \pm 0,03467$) do que no grupo SCA ($0,6723 \pm 0,04340$).

2.2.1.4. A imunodeteção da ALP e da IBSP foi diferente em cada grupo

A microscopia multifóton forneceu imagens 2D do OSB cultivados em diferentes SCA 3D sem (Figura 8.J-8.O) e com APT (Figura 8.P-8.T) em 10 dias. A expressão de ALP foi mais intensa no grupo SCA+OSB ($p < 0,0001$; $115,2 \pm 6,844$) do que no grupo SCA+APT+OSB ($72,74 \pm 4,516$). Em ambos os grupos, o padrão de imunomarcção da ALP (Figura 1.N e 4.S) apresentou aspecto granulomatoso no citoplasma, permitindo clara identificação da morfologia celular e localização das células OSB sobre os SCA.

Diferentemente do ALP, o APT proporcionou elevada marcação da IBSP no OSB ($p = 0,0236$; $13,99 \pm 11,00$) quando comparado ao grupo SCA+OSB ($7,516 \pm 8,947$). A marcação de IBSP em ambos os grupos (Figuras 1.M e 1.R) demonstrou o mesmo padrão de imunodeteção diferente da ALP, sendo mais dispersa e distribuída irregularmente sobre o SCA.

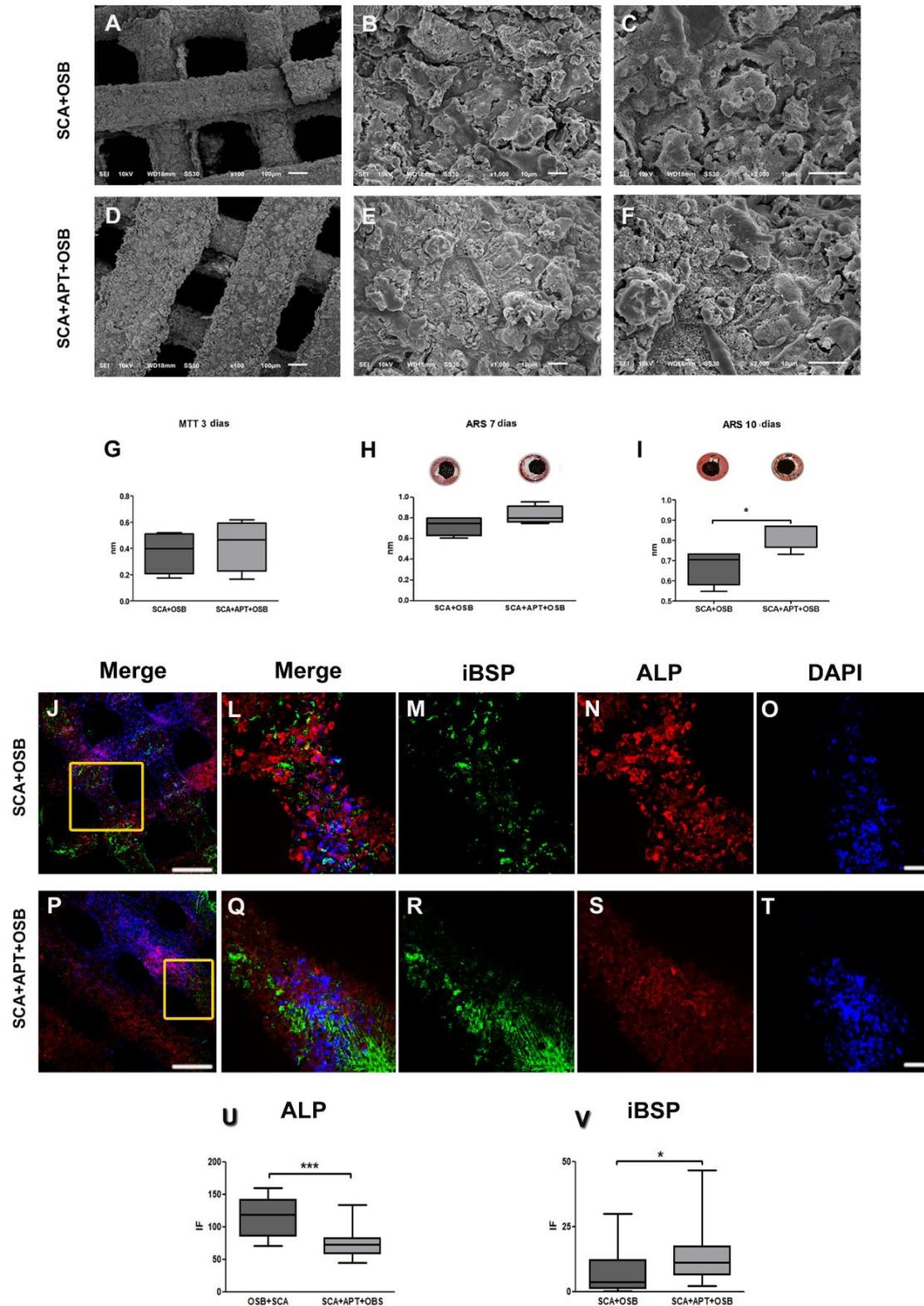


Figura 8. Eletrofotomicrografias mostrando os grupos SCA+OSB (A - C) e SCA+APT+OSB (D - F) no aumento de 100x (A e D), 1000X (B e E) e 2000x (C e F). O ensaio de MTT (G) não detectou diferença entre os grupos. Os gráficos do ensaio de mineralização em 7 dias (H) e em 10 dias (I) revelaram diferença em 10 dias (*) entre os grupos investigados. As imagens de imunofluorescência mostram os OSB cultivados sobre os SCA não funcionalizados (J - O) e funcionalizados (P - T) com APT. A região selecionada (retângulo amarelo) nas imagens no aumento de 5x (J e P) estão em maior aumento na objetiva de 20x (L e Q). O IBSP foi marcado com Alexa Fluor 488 (M e R), a ALP com Alexa Fluor 594 (N e S) e núcleo com DAPI (O e T). A imunoposição de ALP (U) no grupo SCA+APT+OSB (***) foi maior. A marcação IBSP (V) foi mais intensa no grupo SCA+OSB (*). Escala: 10 μ m, 20 μ m, 50 μ m e 100 μ m. Valor de significância: * p < 0,05, *** p < 0,001.

2.2.2. Ensaio *in vivo*

2.2.2.1. Micro-CT

Imagens tridimensionais representativas dos defeitos das calvárias de ratos (Figura 9, A.9 – A.4) e os resultados (Figura 9, A.5 – A.8) mostraram que em 5 dias, ao medir os parâmetros BV/TV (Figura 9 A.5), os SCA funcionalizados com APT induziram mais formação óssea ($p = 0.0360$; 6.897 ± 7.174) em comparação ao grupo SCA (3.345 ± 1.796). O mesmo resultado foi observado quanto à TB.TH - as trabéculas foram mais espessas no grupo SCA+APT ($p = 0,0232$; $5,223 \pm 0,2583$) do que no grupo SCA ($4,266 \pm 0,2666$) (Figura A.6). O fator de padrão trabecular ósseo (TB.PF) (Figura 9 A.7) o grupo SCA foi considerado como tendo mais tecido/osso esponjoso ($p = 0,0123$; $0,5035 \pm 0,05800$) do que em SCA+APT ($0,2665 \pm 0,06081$). Aos 5 dias, o grupo SCA+APT ($92,01 \pm 1,931$) evidenciou estatisticamente menos porosidade (PO.tot) do que o grupo SCA ($p = 0,0324$; $96,84 \pm 0,635$) (Figura 9 A.8)

Em 15 dias, a microarquitetura óssea foi bastante semelhante entre os dois grupos - apenas a espessura trabecular observada no grupo SCA ($p = 0,04$; $5,859 \pm 0,2084$) foi maior do que no SCA+APT ($5,859 \pm 0,2084$)

2.2.2.2. Coloração de Masson

As imagens panorâmicas dos cortes histológicos realizados coronalmente (Figura 9, B.1 – B.4) evidenciaram, em todos os grupos, remanescente do biomaterial utilizado (Figura 9, B.6 – B.9, asterisco) e a formação de um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas (Figura 9, B.6 – B.9, seta). A quantificação do colágeno nessa matriz formada (Figura 9 B.5) mostrou diferença em 5 dias, sendo mais denso no SCA com APT ($p = 0,0168$; $4,809 \pm 0,7066$) quando comparado à SCA ($4,431 \pm 0,6011$).

Adicionalmente, foi visualizado alguns pontos específicos de deposição óssea imatura na região próxima a dura-máter (Figura 9 B.7, seta). Apesar de ter sido mínima essa formação, em 5 dias foi mais perceptível no grupo SCA+APT ($p = 0,0117$; $0,0210 \pm 0,01153$) do que em SCA ($0.00715 \pm 0,003598$).

Morfologicamente, todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório em graus variados, sendo mais evidente no SCA sem APT.

2.2.2.3. Imunofluorescência da ALP e da RUNX2

Quanto ao padrão de marcação, a ALPL e a RUNX2 evidenciaram uma fluorescência em que se pôde visualizar claramente toda a morfologia das fibras colágenas presentes na matriz tecidual formada, prévia à formação óssea.

Após a quantificação da imunomarcação dos diferentes antígenos, em 5 dias a ALPL revelou elevada imunodeteção no grupo SCA+APT ($p = 0.0411$; 56.81 ± 19.17) em comparação à SCA (40.62 ± 1.996). Já a RUNX2 foi observada diferença em 15 dias, mostrando mais imunoexpressão em SCA+APT ($p = 0.0030$; 32.40 ± 1.396) do que em SCA (23.61 ± 2.024).

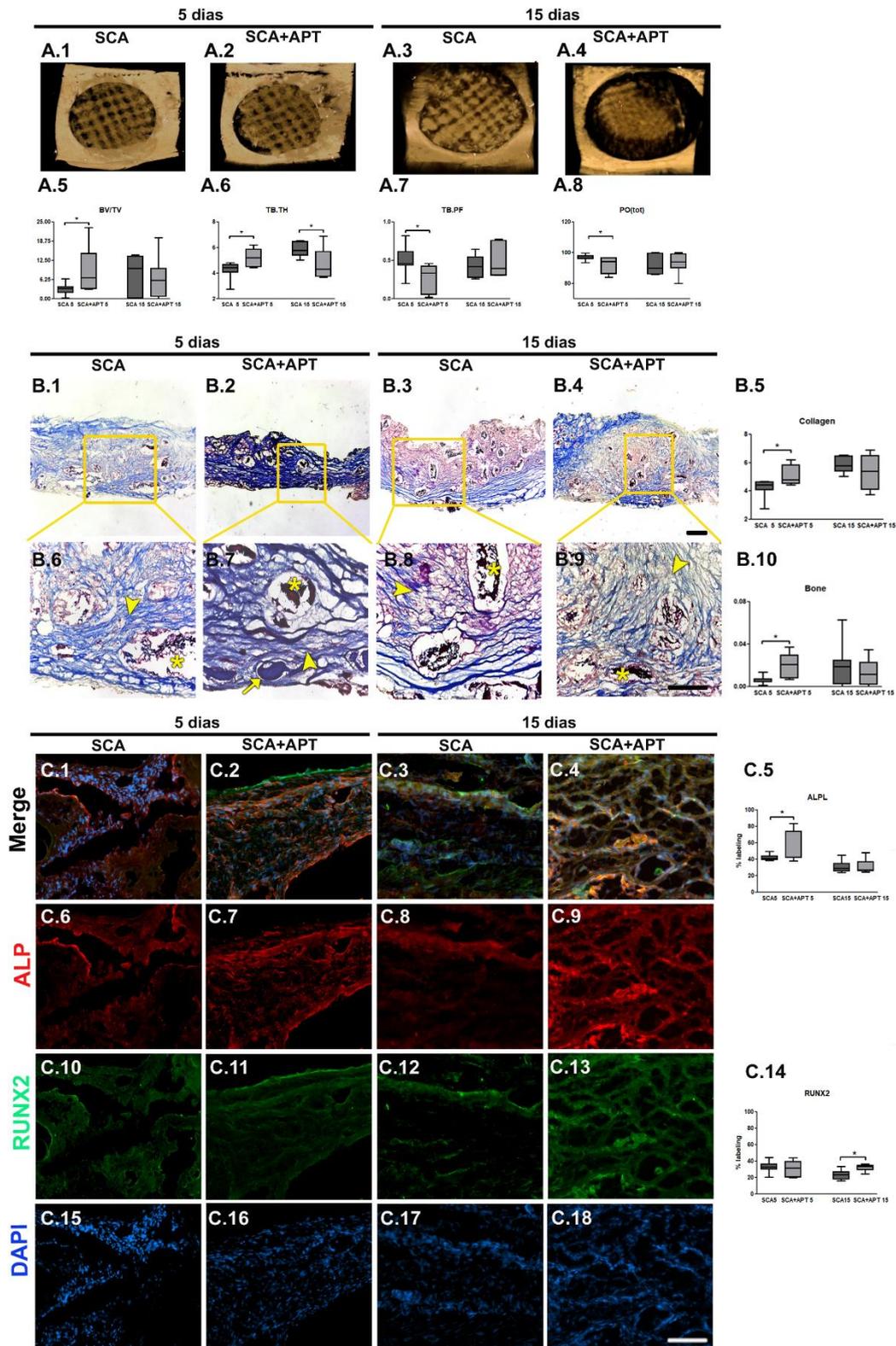


Figura 9. (A.1-A.4) - Reconstruções 3D dos defeitos ósseos preenchidos com biomaterial em diferentes grupos experimentais avaliados. A.5-A.8: gráficos mostrando os resultados das variáveis investigadas pelo Micro-CT. (B.1-B.4) - Coloração com tricrômio de Mason em 1,6x. B.5: gráfico mostrando os resultados da morfometria realizada para quantificar o colágeno formado. (B.6-B.9) - coloração com tricrômio de Mason em 20x.(B.10) - Gráfico mostrando os resultados da morfometria realizada para quantificar o osso neoformado. (C.1-C.4) - Imagens sobrepostas de imunofluorescência dos antígenos avaliados. (C.5) - gráfico apresentando a diferença estatística detectada ao comparar a imunoposição da ALPL. (C.6-C.9) - Imunofluorescência de ALPL (Alexa Flúor 594). (C.10-C.13) - Imunomarcagem da RUNX2 (Alexa Flúor 499). (C.14) - Gráfico ilustrando a comparação realizada em relação à imunodeteção da RUNX2. (C.15-C.18) - Núcleo evidenciado com o DAPI. Escala: 100 µm e 50 µm. Valor da significância: *p<0,05.

2.2.2.4. Análise transcriptômica

A média do controle de qualidade (QC) do RNAseq está descrito detalhadamente na Tabela 3. Os gráficos dos componentes principais (PC) 1 e PC 2 de todas as amostras foram compilados (Figura 10.A). As amostras presentes no PC foram agrupadas de acordo com cada grupo experimental investigado, exceto uma amostra do grupo SCA em 5 dias. Esses dados evidenciaram a precisão do RNAseq, apresentando a integridade dessas amostras usadas no experimento.

Tabela 3 - Resultados do QC da análise transcriptômica por RNAseq dos grupos em diferentes períodos experimentais.

	Nome grupos	Raw bases	Bases limpas	Taxa de erro (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC contente (%)
5 dias	SCA	6.12	6.12	0.03	97.83	93.79	47.86
	SCA+APT	6.15	6.10	0.03	97.57	93.34	47.51
15 dias	SCA	6.15	6.05	0.03	97.92	93.98	48.00
	SCA+APT	5.95	5.82	0.02	98.21	95.14	48.16

O RNAseq foi realizado avaliando dois tempos experimentais, 5 e 15 dias, comparando os grupos SCA e SCA+APT. Em 5 dias (Figura 10.B) foram identificados 1890 genes expressos diferencialmente (DEGs), sendo 1304 regulados positivamente e 586 regulados negativamente ($p < 0,05$; $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$). Em 15 dias (Figura 10.C) houveram 2302 DEGs. Dentre esses, 785 foram regulados positivamente e 1517 regulados negativamente.

As funções ou vias biológicas estão significativamente associadas aos DEGs. Para inferir processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC) aos DEGs foram analisados os termos da GO. Em 5 dias (Figura 10.D), foi detectada diferença nas funções de adesão celular (BP), adesão biológica (BP), atividade do canal iônico (MF), atividade do canal específico do substrato (MF), atividade do canal (MF) e na atividade do

transportador transmembranar passivo (MF) ($p_{adj} < 0,05$). Todas essas funções foram reguladas positivamente, não havendo diferenças entre as negativas. Em 15 dias (Figura 10.E) houve diferenças nas vias biológicas que foram negativas e positivamente reguladas. As reguladas positivamente foram resposta imune (BP), processos do sistema imunológico (BP), processo de oxidação-redução (MF), atividade oxidoreductase (BP), atividade de citocinas (MF), ligação de fosfolipídios dependentes de cálcio (MF), atividade antioxidante (MF), ligação de íons de metais de transição (MF), matriz extracelular (CC) e região extracelular (CC) ($p_{adj} < 0,05$). Os regulados negativamente foram associados ao citoesqueleto (CC), parte citoesquelética (CC), complexo supramolecular (CC), polímero supramolecular (CC), fibra supramolecular (CC), filamento de queratina (CC), fibra citoesquelética polimérica (CC), filamento intermediário (CC) e filamento intermediário do citoesqueleto (CC) ($p_{adj} < 0,05$). Todos o detalhamento das funções e dos seus identificadores da GO, valor do p_{adj} , valor de p , da quantidade dos genes envolvidos (“gene ratio”) e da lista dos DEGs então descritos na Tabela 4.

Apesar de não ter havido diferença na ontologia associada à regeneração óssea, o Heatmap (FPKM, Figura 10.F) com os genes envolvidos ao desenvolvimento osteoblástico (GO:0002076) apresentou os genes mais expressos (coloração vermelha) e menos expressos (coloração azul). Em 5 dias, a IBSP, NID2, PTH1R e SMAD1 foram os mais expressos no grupo APT. Em 15 dias, os mais destacados foram os genes ALPL e HDAC5.

2.2.2.5. Validação da ontologia

Genes específicos foram selecionados para validar a ontologia detectada nos resultados de RNAseq. Para 5 dias, foi selecionada a Vimentina (*Vim*), Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1 (*Hprt1*, sigla em inglês), Canais de cloreto dependentes de voltagem 4 (*Clcn4*, sigla em inglês) e Agrupamento de Diferenciação 24 (*Cd24*, sigla em inglês). Os resultados revelaram que em 5 dias o grupo SCA+APT mostrou mais detecção gênica da *Cd24* ($p = 0,0017$; $5,757 \pm 0,6096$) e da *Vim* ($p = 0,0294$; $2,042 \pm 1,820$) em comparação à SCA (*Cd24* = $1,391 \pm 0,5363$; *Vim* = $0,4625 \pm 0,06185$), estes associados a adesão celular. Em contrapartida, a *Clcn4*, gene relacionado aos canais iônicos da membrana

celular, foi mais expressa no grupo SCA ($p = 0,0421$; $5,833 \pm 1,639$) em relação à SCA+APT ($1,563 \pm 0,2508$) em 15 dias.

Para validação da ontologia em 15 dias, foram selecionados os genes Proteína Associada à Queratina 7-1 (*Krtap7-1*, sigla em inglês), Subunidade Ativadora de Proteassoma 2 (*Psme2*, sigla em inglês), Fator de Necrose Tumoral (*Tnf*, sigla em inglês) e Interleucina 1 beta (*Il-1 β*). A *Krtap7-1*, associado diretamente ao citoesqueleto, mostrou mais expressão em SCA+APT ($p = 0,0286$; $553,9 \pm 6483$) do que em SCA ($0,1700 \pm 0,1187$). Interessantemente, na resposta imune, o grupo SCA evidenciou mais expressão gênica para *Tnf* ($p = 0,0004$; $1,384 \pm 0,1807$) em 5 dias e da *Il-1 β* em 15 dias ($p = 0,0055$; $1,723 \pm 0,04888$) em relação à SCA+APT (*Tnf* = $0,1285 \pm 0,01097$; *Il-1 β* = $0,6745 \pm 0,2425$).

Dos genes associados ao desenvolvimento osteoblástico, a *Alpl* e o *Runx2* foram os mais detectados nos grupos APT tanto em 5 dias (*Alpl*: $p = 0,0286$; $1,287 \pm 2,116$ / *Runx2*: $p = 0,0293$; $1,576 \pm 0,3933$) como em 15 dias (*Alpl*: $p = 0,0006$; $2,159 \pm 0,2742$ / *Runx2*: $p = 0,0495$; $1,373 \pm 0,2462$) quando comparados à SCA (5 dias: *Alpl* = $1,978 \pm 2,116$ / *Runx2* = $0,4098 \pm 0,1139$; 15 dias: *Alpl* = $0,2583 \pm 0,09391$ / *Runx2* = $0,6780 \pm 0,1400$). O gene *Bglad* demonstrou diferentes resultados nos períodos avaliados, sendo em 5 dias mais prevalente em SCA ($p = 0,0207$; $0,2243 \pm 0,1356$) do que em SCA+APT ($0,2243 \pm 0,1356$), sendo observado o inverso em 15 dias ($p = 0,0066$; SCA+APT: $0,9850 \pm 0,2283$ / SCA: $0,05475 \pm 0,008693$). O gene *Ibsp* houve diferença apenas em 5 dias, sendo mais prevalente em SCA+APT ($p = 0,0264$; $0,6828 \pm 0,1733$) do que em SCA ($0,1583 \pm 0,04543$).

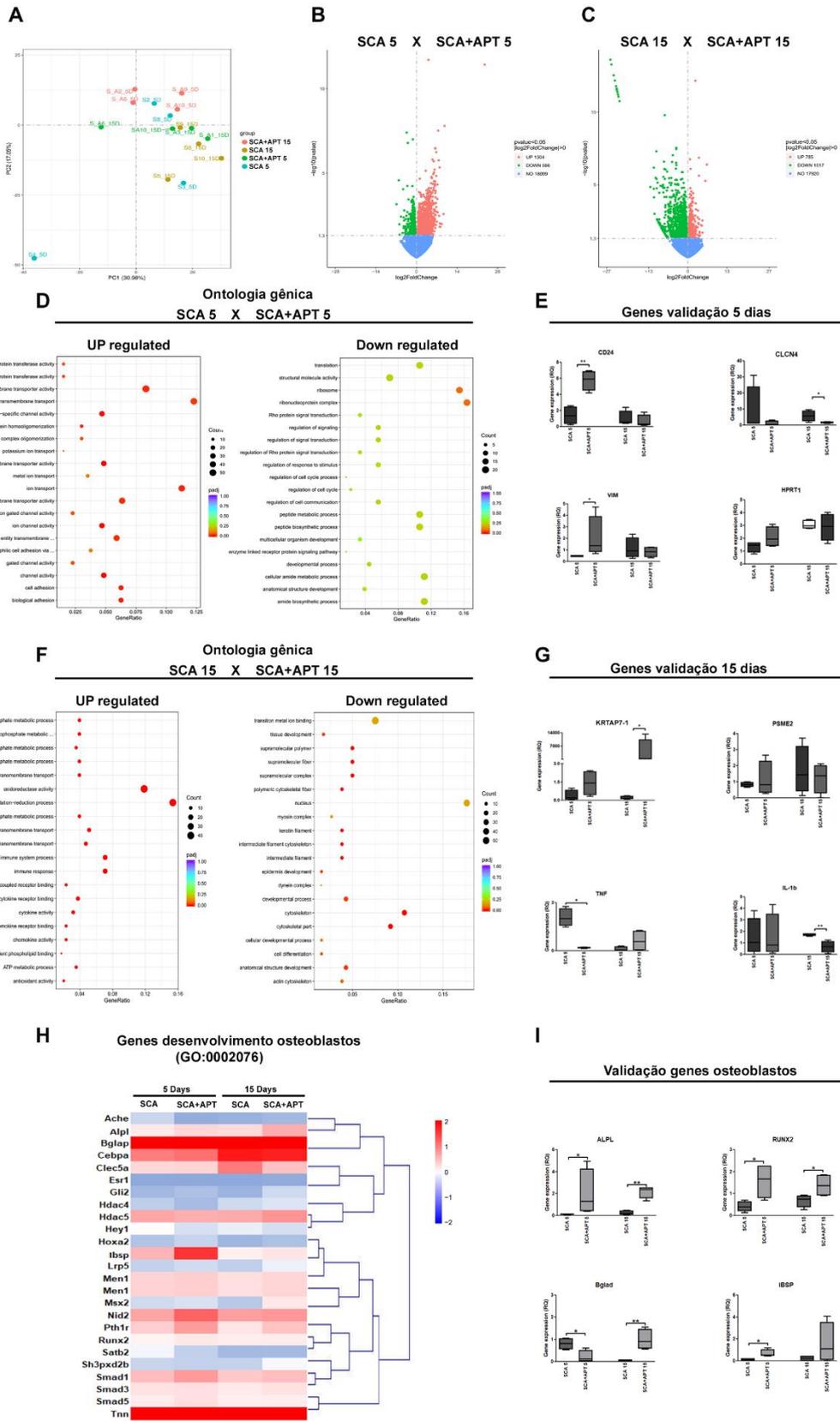


Figure 10. (A) - Gráficos compilados dos componentes principais 1 (PC 1) e 2 (PC 2) para todas as amostras analisadas nos grupos SCA e SCA+APT em 5 e 15 dias. (B) - DEGs em 5 dias. (C) - DEGs em 15 dias. (D) - GO em 5 dias. (E) - Validação da GO em 5 dias. (F) - GO em 15 dias. (G) - Validação da GO em 15 dias. (H) - Heatmap dos genes associados à diferenciação osteoblástica. (I) - Validação dos genes associados à diferenciação osteoblástica. Valor da significância: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 4 - Descrição dos termos da GO com seus identificadores (GO ID), o raio de genes avaliados (Gene ratio), valor de p , valor de p ajustado (padj) e sigla dos DEGs envolvidos nas funções descritas, observados no RNAseq.

5 dias					
Função	GO ID	Gene ratio	Valor de p	padj	Sigla dos DEG's
• Adesão celular	GO:0007155	31 578	7.93E-05	0.014865	Ctnna2/Pcdh9/Lama5/Ncan/Cdh18/Bcan/Cdh20/Pcdhb17/Dchs1/AABR07061178.1/Pcdhb10/Pcdhb11/Pcdhgb7/Hapln2/Kitlg/Pcdhgc3/Sned1/Tecta/Lyve1/Cd24/Pcdhb9/Pcdhga1/Cdh5/Cd4/Ap1ar/Pcdhgb8/AC131360.1/Cdh22/Pcdh19/Cdhr2/Pcdhga8
• Adesão biológica	GO:0022610		7.93E-05	0.014865	
• Atividade do canal iônico	GO:0005216		0.000327	0.031267	
• Atividade de canal específica do substrato	GO:0022838	36 948	0.000327	0.031267	Gabra1/Gabrg1/Kcnc4/Cicn4/Kcnc3/Cacnb4/Asic2/Cacnb2/Cacna1d/Kcnv1/Gabrb2/LOC100912455/Glra2/Kcna5/Glrb/Kcng4/Kcnh1/Scn8a/Hvcn1/Kcnn2/Grin2c/Kcnh4/Kcnmb2/Cln3/Aqp4/Kcnn1/Trpv4/Cacna1e/Kcna1/Scn7a/Trpv1/Kcnc3/Itp3/Kcna2/Grin3b/Gabrb1
• Atividade do canal	GO:0015267		0.000444	0.031267	
• Atividade do transportador passivo transmembranar	GO:0022803		0.000444	0.031267	

15 dias					
Função	GO ID	Gene ratio	Valor de p	padj	Sigla dos DEG's
• Resposta imune	GO:0006955		7.93E-05	0.014865	Prg4/Pf4/Endou/Ccl9/Ccl6/Cxcl1/Tnfs13/Il1f10/Ccl2/Ccl24/Cxcl3/Tnfs10/Osm/Ahsp/Ccl3/Ltb/Il1rn/Gcsam/Il36rn/Enpp3/Il1b/Il7/Ccl27/Il36g/Lst1/Lax1/Tnf
• Processo do sistema imunológico	GO:0002376	27 699	7.93E-05	0.014865	
• Processo de oxidação e redução	GO:0005856		0.0001421	0.0213663	Cpa3/Trim29/Cpa4/Cyp7b1/Gata3/Mmp19/Mmp12/Cpa1/Cpxm2/Ptgis/Cyp4v3/Rxrb/Cyp2ab1/Trim54/Setdb1/Sec23b/Trim13/Recql4/Ubr4/Mta1/Prickle3/Ehmt2/Mmp9/Cyp20a1/Vdr/Dtnb/Pter/Heph11/Trim39/Rarg/Kmt2b/Rere/Heph/Trim11/Trim72/Mib2/AC129162.1/Zmym6/Upl1/AABR07054189.1/Trim63/Tes/Mmp8/Mmp13/Mmp27/Zcchc7/LOC100912391/Lta4h/LOC100911822/Cpm/Setdb2/Mmp3/Cyp4f39/Ppm1a/Aoc3/LOC100359668/Mmp10/Cyp27a1/Adamts20/F5/Zswim3/Ubr2/Kdm2a/F8/Pias4/Tbxas1/Trim6/Zzef1/Trim34/Pml/AABR07054045.1/Fbxo40/Kmt2a/Morc2/Rxrg/Cyp26b1/Crebbp/Cyp39a1/Cyp2b21
• Atividade oxidorreductase	GO:0016491		9.62E-05	0.0284747	
• Atividade de citocina	GO:0005125	79 1118	0.0003293	0.0338709	
• Ligação de fosfolípidios dependentes de cálcio	GO:0005544		0.0003649	0.0338709	
• Atividade antioxidante	GO:0016209		0.0004577	0.0338709	
• Ligação de iônica do metais de transição	GO:0046914		0.0008233	0.0487401	
• Região extracelular	GO:0005576	49 428	0.000651	0.006804	Pinlyp/c4a/Pf4/Mmp19/Mmp12/Ccl9/Ccl6/Cxcl1/ratnp-3b/Nppb/Gal/Wfikkn1/Il1f10/Mmp9/Ccl2/Wfdc1/AABR07058464.1/Ccl24/Cxcl3/c4b/Saal1/Osm/Fn1/Ccl3/Mmp8/LOC100910885/Mmp13/Mmp27/LOC100912228/LOC100911545/Il1rn/Wnt10b/Mmp3/Sostdc1/Wnt10a/Il36rn/Mmp10/Vip/LOC100910885/Il1b/Wnt3/Il7/Ccl27/Il36g/Defa5/Wfdc5/Wisp2/Sst/Wnt5a
• Matriz extracelular	GO:0031012		0.004043	0.038749	
• Citoesqueleto	GO:0005856	35 428	3.14E-06	0.0003608	Tnni1/Dsp/Myh3/Dnah1/Myh7/Dnhd1/LOC100911597/Vim/Plekhh3/Dnah8/Tnnt1/Krtap1-1/Krtap3-1/Arhgap39/Krtap3-311/Myo7b/Myo9b/Dnah2/Krtap1-5/Krtap3-3/Myh7b/Krtap2-4/Arcp2/LOC100365588/Arcp3/Tnni3/Myh14/Capzb/Krtap1-3/Krtap31-1/Myh15/Plekhh1/Nusap1/Haus4/Krtap9-1
• Parte do citoesqueleto	GO:0044430		6.67E-06	0.0003838	
• Complexo supramolecular	GO:0099080		6.04E-05	0.0013896	
• Polímero supramolecularr	GO:0099081		6.04E-05	0.0013896	

• Fibra supramolecular	GO:0099512	6.04E-05	0.0013896
• Filamento de queratina	GO:0045095	0.0001606	0.0030785
• Fibra citoesquelética polimérica	GO:0099513	0.0003785	0.0052333
• Filamento intermediário	GO:0005882	0.0004550	0.0052333
• Filamento intermediário do citoesqueleto	GO:0045111	0.0004550	0.0052333

2.3. DISCUSSÃO

Este estudo verificou, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, como a adsorção de APT anti-FN em SCA 3D a base de quitosana/ β -TCP leva a modificações estruturais e funcionais. Foi claramente notado que os APT alteraram os eventos iniciais associados à osteoimunologia, favorecendo os processos regenerativos ósseos.

A análise *in vitro* evidenciou que a adsorção do APT nos SCA aumenta a expressão da IBSP e interfere na mineralização dos OSB. Nos experimentos *in vivo*, o APT induziu à formação de uma matriz tecidual rica em colágeno, à formação óssea e elevada imunodeteção da ALP em 5 dias. Além disso, a expressão da RUNX2 foi predominante no grupo APT em 15 dias. A ontologia genética identificada por RNAseq mostrou diferenças nas funções biológicas nos eventos prévios à formação óssea. Em 5 dias, houve diferença nas funções associadas à adesão celular e aos canais iônicos. Em 15, houveram alterações principalmente na resposta imune, na oxidação-redução (REDOX, sigla em inglês) e no citoesqueleto celular. Esses achados evidenciam o papel substancial do APT na melhora dos eventos iniciais associados a osteoimunologia envolvendo SCA 3D.

O enriquecimento da superfície de biomateriais com APT tem revelado efetividade na adesão, proliferação e diferenciação osteoblástica (PARISI et al., 2017; GHEZZI et al., 2019). Nossos resultados ilustraram que o APT levou à melhora nos padrões de formação da matriz mineralizada e na expressão da IBSP em 10 dias. Essa fosfoproteína é responsável pela consolidação da hidroxiapatita, sintetizada pelos OSB, no colágeno da MEC (HOLM et al., 2015). Essas evidências demonstram a direta relação entre elevada expressão da IBSP e deposição da matriz mineralizada induzida pelo APT em 10 dias.

Corroborando com esses achados, os resultados *in vivo* mostraram maior volume ósseo e mais deposição de colágeno estimulado pelo APT em 5 dias. Na formação óssea, a FN é conhecida por participar dos estágios iniciais da osteogênese (FAIA-TORRES et al., 2015), possivelmente por estar intimamente ligada à formação da MEC (CHATAKUN et al., 2014). Adicionalmente, evidências demonstram que a FN pode servir como reservatório de inúmeros fatores de crescimento por permitir a ligação dos mesmos à sua estrutura (RAHMAN et al., 2005; WIJELATH et al., 2006; LIN et al., 2011, 2014; ZHU & CLARK, 2014). A adsorção do APT anti-FN sobre os SCA deve ter acarretado ao enriquecimento dessa glicoproteína adesiva sobre sua superfície, induzindo maior proliferação de fibras colágenas e subsequente antecipação da formação da matriz óssea.

A ontologia e a posterior validação de determinados genes evidenciaram que as funções associadas à adesão celular e aos canais iônicos foram intensificadas pelo APT em 5 dias. A FN, após levar à formação da rede fibrilar na MEC, servirá como substrato para a adesão celular mediada principalmente pelos receptores de integrina (SCHWARZBAUER & DESIMONE, 2011). Essa interação célula-integrina permitirá rápida conexão entre o microambiente celular e sua fisiologia (LIDDINGTON & GINSBERG, 2002). Isso estimulará o fluxo de íons nos canais iônicos (ARCANGELI et al., 1991; ARCANGELI & BECCHETTI, 2010), gerando significativo efeito na proliferação e diferenciação celular (Davis, 2002). Logo, o APT resulta em maior adsorção da FN sobre o SCA, favorecendo a adesão celular e maior fluxo nos canais iônicos que são regulados indiretamente pelas integrinas. Com mais adesão de diferentes tipos celulares, haverá mais síntese da MEC e, conseqüentemente, mais alteração no citoesqueleto. Essas diferenças funcionais foram observadas em 15 dias, sendo mais prevalente no SCA com APT após observar a expressão gênica da *Krtap7-1*.

Adicionalmente, foram presenciadas diferenças nas funções biológicas ligadas à MEC, à resposta imune e ao processo REDOX em 15 dias. Os genes selecionados para validação mostraram mais expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios (*Tnf* e *Il-1 β*) nos SCA sem APT. A resposta imune desencadeada pelos biomateriais induz células inflamatórias a secretarem

espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas proteolíticas, visando a degradação do material para sua fagocitose (WILLIANS, 2017; YANEZ et al., 2017). A fisiologia associada ao sistema REDOX intracelular depende substancialmente do equilíbrio entre agentes oxidantes, como as ROS, e antioxidantes (VALCO et al., 2007). O desequilíbrio entre essa relação leva ao estresse oxidativo, resultando em danos celulares por meio da oxidação lipídica (NAKA et al., 2008). Não obstante, durante a remodelação tecidual associada com biomateriais, o estresse oxidativo pode influenciar na produção das metaloproteinases (MMPs), enzimas correlacionadas à degradação da MEC (CERQUENI et al., 2021). Além disso, a resposta imunoinflamatória excessiva do hospedeiro pode causar destruição tecidual (ADJEI et al., 2016). Assim, essas evidências mostram que a funcionalização dos SCA com APT tem efeito anti-inflamatório e antioxidante na osteoimunoinflamação.

O osso é um tecido dinâmico constituído por células ósseas inseridas em uma matriz orgânica e inorgânica organizada (LICINI et al., 2019). Altos níveis de ROS bloqueiam e reduzem a atividade e diferenciação osteoblástica (ROMAGNOLI et al., 2013), além de induzir apoptose (JIKA et al., 2013), dificultando a formação óssea (DOMAZETOVIC et al., 2017; CERQUENI ET al., 2021). Nossos achados mostraram elevada imunomarcação da ALPL e da RUNX2 nos SCA's com APT em diferentes tempos experimentais. O mesmo foi visualizado com os principais genes associados à diferenciação osteoblástica - a *Alpl*, *Runx2*, *Bglap* e *Ibsp*. Assim, o APT provavelmente estimula a osteogênese de forma direta por meio da FN e indiretamente por reduzir a resposta imune e os níveis de ROS.

Finalizando, os SCA funcionalizados com APT anti-FN potencializam a osteogênese - os eventos iniciais que compreendem a formação óssea foram significativamente alterados pela presença deste oligonucleotídeo. Este, acaba atuando diretamente na adesão celular (via integrinas) e indiretamente na modulação da resposta inflamatória e nos níveis de ROS associados ao sistema REDOX.

2.4. CONCLUSÕES

- O APT, quando adsorvido sobre a superfície de SCA 3D a base de quitosana e β -TCP, potencializa a osteogênese em células osteoblásticas;
- Em 5 dias, os SCA funcionalizados com APT proporcionaram a formação de um tecido enriquecido com colágeno e melhora no padrão de formação óssea;
- Os eventos iniciais associados à osteoimunologia foram significativamente alterados com a presença do APT. Este possivelmente atuou diretamente na adesão celular (via integrinas) e indiretamente na modulação da resposta inflamatória por intermédio do sistema REDOX.

Considerações finais

Nesta pesquisa foi investigado o efeito de SCA 3D funcionalizados com APT anti-FN na osteogênese em ensaios *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Os resultados *ex vivo* mostraram que o APT melhorou o padrão de coagulação, levando a formação de uma densa rede de fibrina enriquecida com células progenitoras e imunoinflamatórias. Além disso, o PhC formado sobre os SCA funcionalizados com APT provocou elevada detecção da ALP, da IBSP e do TGF-1 β , evidenciando favorecimento da osteodiferenciação dos OSB. Nos ensaios *in vitro*, o APT, quando adsorvido sobre a superfície de SCA 3D a base de quitosana e β -TCP, potencializa a eventos que refletem a diferenciação osteoblásticas. No estudo *in vivo*, os APT adsorvidos nos SCA proporcionaram a formação de um tecido enriquecido com colágeno e melhora no padrão de formação óssea em períodos bem precoces. Os eventos iniciais associados à osteoimunologia foram significativamente alterados com a presença do APT. Observou-se que a funcionalização com esse oligonucleotídeo atuou diretamente na adesão celular (via integrinas) e indiretamente na modulação da resposta inflamatória por intermédio do sistema REDOX. Em conjunto, essas evidências mostram o potencial osteogênico dos APT sobre a superfície de biomateriais, em especial SCA 3D a base de quitosana e β -TCP.

Referências

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, v. 11, n. 10, p. R106, 2010.

ANNABI, N. et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, v. 16, n. 4, p. 371–383, 2010.

ARCANGELI, A.; BECCHETTI, A. Integrin structure and functional relation with ion channels. *Adv Exp Med Biol*, v. 674, p. 1–7, 2010.

ASTI, A.; GIOGLIO, L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs*, v. 37, n. 3, p. 187-205, Mar 2014.

BEERAVOLU, N. et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *J Vis Exp*, n. 122, Apr 3 2017.

BENCHERIF, S. A.; BRASCHLER, T. M.; RENAUD, P. Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *J Periodontal Implant Sci*, v. 43, n. 6, p. 251-61, Dec 2013.

BERTASSONI, L. E. et al. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab Chip*, v. 14, n. 13, p. 2202–2211, 2014.

BROUWER, K. M. et al. Mechanical cues in orofacial tissue engineering and regenerative medicine. *Wound Repair Regen*, v. 23, n. 3, p. 302-11, May-Jun 2015.

CERQUENI, G. et al. Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, v. 130, p. 112433, 2021.

CHATAKUN, P. et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci*, v. 71, n. 1, p. 113–142, 2014.

CHEGINI, N. Proinflammatory and profibrotic mediators: principal effectors of leiomyoma development as a fibrotic disorder. *Semin Reprod Med*, v. 28, n. 3, p. 180-203, May 2010.

CHEN, F. M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci*, v. 53, p. 86-168, Feb 01 2016.

DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*, v. 67, n. 8, p. 932-49, Aug 2003.

DAVIS, R. P.; MILLER-DOREY, S.; JENNE, C. N. Platelets and coagulation in infection. *Clin Transl Immunology*, v. 5, n. 7, p. e89, Jul 2016.

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

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DOMAZETOVIC, V. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab*, v. 14, n. 2, p. 209–216, 2017.

ELSAFADI, M. et al. Convergence of TGFbeta and BMP signaling in regulating human bone marrow stromal cell differentiation. *Sci Rep*, v. 9, n. 1, p. 4977, Mar 21 2019.

ENGLER-PINTO, A. et al. Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clin Oral Implants Res*, v. 30, n. 10, p. 962–976, 2019.

FAIA-TORRES, A. B. et al. Regulation of human mesenchymal stem cell osteogenesis by specific surface density of fibronectin: a gradient study. *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 7, n. 4, p. 2367–2375, 2015.

FAN, Q. et al. Implantable blood clot loaded with BMP-2 for regulation of osteoimmunology and enhancement of bone repair. *Bioact Mater*, v. 6, n. 11, p. 4014-4026, Nov 2021.

GALLI, C. et al. Improved scaffold biocompatibility through anti-Fibronectin aptamer functionalization. *Acta Biomater*, v. 42, p. 147–156, 2016.

GOLUB, E. E. et al. The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. *Bone Miner*, v. 17, n. 2, p. 273-8, May 1992.

GRAINGER, D. J.; MOSEDALE, D. E.; METCALFE, J. C. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 11, n. 1-2, p. 133-45, Mar-Jun 2000.

GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, v. 329, n. 1, p. 77–84, 2004.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, v. 5, p. 1-16; discussion 16, May 20 2003.

HALPER, J.; KJAER, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, v. 802, p. 31-47, 2014.

HANKENSON, K. D.; GAGNE, K.; SHAUGHNESSY, M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 94, p. 3-12, Nov 1 2015.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug 15 2010.

HOEMANN, C. D. et al. Effect of chitosan and coagulation factors on the wound repair phenotype of bioengineered blood clots. *Int J Biol Macromol*, v. 104, n. Pt B, p. 1916-1924, Nov 2017.

HOLM, E. et al. Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization. *Bone*, v. 71, p. 145–154, 2015.

HOLM, E. et al. Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization. *Bone*, v. 71, p. 145-54, Feb 2015.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. *Bone*, v. 54, n. 2, p. 264–271, 2013.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, v. 26, n. 27, p. 5474-91, Sep 2005.

KEEFE, A. D.; PAI, S.; ELLINGTON, A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 9, n. 7, p. 537-50, Jul 2010.

KIM, I. et al. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A*, v. 19, n. 21-22, p. 2373-81, Nov 2013.

LICINI, C.; VITALE-BROVARONE, C.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 49, p. 59–69, 2019.

LIDDINGTON, R. C.; GINSBERG, M. H. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol*, v. 158, n. 5, p. 833–839, 2002.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, v. 32, n. 3, p. 477-86, Mar 2004.

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.

MA, W. et al. Engineering a Facile Aptamer "Molecule-Doctor" with Hairpin-Contained I-Motif Enables Accurate Imaging and Killing of Cancer Cells. *Anal Chem*, v. 93, n. 43, p. 14552-14559, Nov 2 2021.

MAJI, K. et al. Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Int J Biomater*, v. 2016, p. 9825659, 2016.

MASCINI, M.; PALCHETTI, I.; TOMBELLI, S. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew Chem Int Ed Engl*, v. 51, n. 6, p. 1316-32, Feb 6 2012.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*, v. 43, n. 6, p. 723–729, 2008.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. The clotting system - a major player in wound healing. *Haemophilia*, v. 18 Suppl 5, p. 11-6, Jul 2012.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

NAKA, K. et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, v. 10, n. 11, p. 1883–1894, 2008.

NURDEN, A. T. Platelet membrane glycoproteins: a look back into the past and a view to the future. *Thromb Haemost*, v. 98, n. 1, p. 49-54, Jul 2007.

PARISI, L. et al. Functional Fibronectin Adsorption on Aptamer-Doped Chitosan Modulates Cell Morphology by Integrin-Mediated Pathway. *Materials (Basel)*, v. 12, n. 5, 2019.

PARISI, L. et al. Anti-fibronectin aptamers improve the colonization of chitosan films modified with D-(+) Raffinose by murine osteoblastic cells. *J Mater Sci Mater Med*, v. 28, n. 9, p. 136, Sep 2017.

PARK, S. et al. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. *J Mater Sci Mater Med*, v. 20, n. 1, p. 229–234, 2009.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 50, n. 1, p. 27-46, Jul 2000.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, v. 36 Suppl 3, p. S5-7, Nov 2005.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, n. 1, p. 33-45, Jan 2003.

RAHMAN, S. et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol*, v. 6, n. 1, p. 8, Feb 17 2005.

RAZINIA, Z. et al. Stiffness-dependent motility and proliferation uncoupled by deletion of CD44. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 16499, Nov 28 2017.

RHEINLANDER, A.; SCHRAVEN, B.; BOMMARDT, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett*, v. 196, p. 22-32, Apr 2018.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: MARKOSSIAN, S.;GROSSMAN, A., et al (Ed.). *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD), 2004.

ROBERTSON, I. B. et al. Latent TGF-beta-binding proteins. *Matrix Biol*, v. 47, p. 44-53, Sep 2015.

ROMAGNOLI, C. et al. Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *FEBS J*, v. 280, n. 3, p. 867–879, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*, v. 17, n. 2, p. 153-62, Mar-Apr 2009.

SCHWARZBAUER, J. E.; DESIMONE, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 3, n. 7, 2011.

SHIU, H. T. et al. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Eng Part B Rev*, v. 20, n. 6, p. 697-712, Dec 2014.

SHORT, A. R. et al. Hydrogels That Allow and Facilitate Bone Repair, Remodeling, and Regeneration. *J Mater Chem B Mater Biol Med*, v. 3, n. 40, p. 7818–7830, 2015.

SILLER, A. F.; WHYTE, M. P. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res*, v. 33, n. 2, p. 362-364, Feb 2018.

SU, W. T. et al. Osteogenic differentiation and mineralization of human exfoliated deciduous teeth stem cells on modified chitosan scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, v. 41, p. 152-60, Aug 1 2014.

TEJERO, R. et al. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry with principal component analysis of titania-blood plasma interfaces. *Langmuir*, v. 29, n. 3, p. 902-12, Jan 22 2013.

THRIVIKRAMAN, G. et al. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am*, v. 61, n. 4, p. 835-856, Oct 2017.

VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, v. 754, p. 144855, Sep 5 2020.

WANG, Y.; NI, H. Fibronectin maintains the balance between hemostasis and thrombosis. *Cell Mol Life Sci*, v. 73, n. 17, p. 3265-77, Sep 2016.

WILLIAMS, D. F. Biocompatibility Pathways: Biomaterials-Induced Sterile Inflammation, Mechanotransduction, and Principles of Biocompatibility Control. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, v. 3, n. 1, p. 2–35, 2017.

WU, M.; CHEN, G.; LI, Y. P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*, v. 4, p. 16009, 2016.

XU, X. R. et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thromb J*, v. 14, n. Suppl 1, p. 29, 2016.

YANEZ, M.; BLANCHETTE, J.; JABBARZADEH, E. Modulation of Inflammatory Response to Implanted Biomaterials Using Natural Compounds. *Curr Pharm Des*, v. 23, n. 41, p. 6347–6357, 2017.

YANG, Y.; XIAO, Y. Biomaterials Regulating Bone Hematoma for Osteogenesis. *Adv Healthc Mater*, p. e2000726, Jul 21 2020. ISSN 2192-2659 (Electronic) 2192-2640.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics-a Journal of Integrative Biology*, v. 16, n. 5, p. 284–287, 2012.

ZHU, J.; CLARK, R. A. F. Fibronectin at select sites binds multiple growth factors and enhances their activity: expansion of the collaborative ECM-GF paradigm. *J Invest Dermatol*, v. 134, n. 4, p. 895–901, 2014.

Anexo

Anexo A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 058/2018

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2018.

Ref. processo nº 2018.1.247.58.7

Senhor(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 58ª Sessão, realizada em 13/06/2018, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Arcabouços 3D funcionalizados com Aptamers anti-fibronectina na formação do coágulo. Estudo ex vivo e in vivo" emitindo o certificado anexo.

A Comissão deliberou, também, informar que Vossa Senhoria atendeu ao questionamento da CEUA, indicando que para o experimento ex vivo serão necessários 48 animais. Esta informação consta de maneira clara no formulário, mas deve estar presente também no projeto.

Dessa forma, **deverá ser providenciada a correção das informações no projeto, com envio a esta Comissão, para ser juntado ao processo, até o dia 27/06/2018.**

Informamos, ainda, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 13/08/2020, o Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr.(a)

Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto

Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia
desta Faculdade

./aafn

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Arcabouços 3D funcionalizados com Aptamers anti-fibronectina na formação do coágulo. Estudo ex vivo e in vivo**”, Protocolo nº 2018.1.247.58.7, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Daniela Bazan Palioto – 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 13/06/2018.

Vigência do Projeto	13/06/2018 a 13/07/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar Hannover
Nº de animais	128
Peso/Idade	250-300 g/ 3 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2018.


Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais