



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



ALANN THAFFARELL PORTILHO DE SOUZA

**Efeitos das interações entre células-tronco mesenquimais
de ratos saudáveis e com osteoporose, diabetes mellitus
ou hipertensão arterial na diferenciação osteoblástica
e na regeneração de defeitos ósseos**

RIBEIRÃO PRETO

2022

ALANN THAFFARELL PORTILHO DE SOUZA

Efeitos das interações entre células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis e com osteoporose, diabetes mellitus ou hipertensão arterial na diferenciação osteoblástica e na regeneração de defeitos ósseos

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

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

VERSÃO ORIGINAL

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Souza, Alann Thaffarell Portilho de

Efeitos das interações entre células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis e com osteoporose, diabetes mellitus ou hipertensão arterial na diferenciação osteoblástica e na regeneração de defeitos ósseos. Ribeirão Preto, 2022.

244p.: il.; 30cm

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

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

Coorientador: Beloti, Márcio Mateus

Versão Original

1. Célula-tronco mesenquimal; 2. Diabetes mellitus; 3. Hipertensão arterial; 4. Osso; 5. Osteoporose; 6. Terapia celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SOUZA, ATP. **Efeitos das interações entre células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis e com osteoporose, diabetes mellitus ou hipertensão arterial na diferenciação osteoblástica e na regeneração de defeitos ósseos**

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

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Bone Research Lab, que envolve os Laboratórios de Cultura de Células, Biologia Molecular, Histologia e LAB 3D BIO e no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Hemocentro de Ribeirão Preto, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Bolsa de Doutorado (Processo nº 2018/13290-0) e Auxílio à Pesquisa-Temático (Processo nº 2017/12622-7).

DEDICATÓRIA

DEDICO

Dedico este trabalho à minha mãe **Liduína Portilho de Souza**, a mulher mais incrível desse mundo e meu modelo de caráter e honestidade.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e à **Nossa Senhora de Nazaré** por me abençoarem tanto em todas as etapas da pós-graduação, trilhando meu caminho e permitindo que eu encontrasse pessoas especiais que me ajudaram na realização desse sonho.

Ao **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**, pela orientação desse trabalho; por me permitir fazer parte de um dos melhores grupos de pesquisa do mundo, por dar todas as condições necessárias para que essa pesquisa fosse realizada, sempre prezando pela qualidade e excelência; por ser um transformador de vidas, mudando a minha realidade e de muitas pessoas que passam por sua orientação; por ser um exemplo de professor e pesquisador, referência na sua área de pesquisa, o que faz com que eu tenha muito orgulho em ser um de seus alunos; por estar sempre presente em todas as etapas; pela sua disposição e capacidade de fomentar um diálogo científico crítico; por todo o conhecimento transmitido; e pela amizade e trato simples, que permitiram que o trabalho fosse sempre agradável.

Ao **Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**, meu grande amigo, que fez por mim coisas grandiosas que eu nunca esquecerei, pelas várias oportunidades que me deu profissional e pessoalmente, acreditando no meu potencial e permitindo que eu trabalhasse em vários projetos paralelos; pelas inúmeras conversas científicas que tivemos, que me permitiram aprender e amadurecer profissionalmente, cujos ensinamentos eu levarei para o resto da vida; por compartilhar comigo as melhores experiências culturais que eu já vivi; por estar sempre disposto a me ajudar a conseguir meus objetivos, escancarando portas e me incentivando sempre a ser melhor e pelos conselhos que fizeram que muitos dos meus sonhos se realizassem.

Aos meus pais, **Liduína Portilho de Souza** e **Suzivaldo Oliveira de Souza** (*in memoriam*), pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas e decisões, pelo amor incondicional e, apesar de todas as dificuldades, não medirem esforços para que eu tivesse a melhor educação possível. À ela, especialmente, a mulher mais perseverante e benevolente que eu conheço, meu maior exemplo de garra e determinação, que enfrenta obstáculos diários de cabeça erguida e ajuda ao próximo sem pedir nada em troca.

À minha irmã, **Anna Thanny**, pelo amor e carinho, e ao **Théo**, meu sobrinho amado, que desde que chegou mudou nossa família e fez nossos dias serem melhores.

À **Vovó Marly**, por ter sido pai e mãe durante grande parte de minha vida e me deu as condições necessárias para que eu iniciasse minha trajetória acadêmica.

À **Paula Pessoa**; companheira de todas as horas pelo incentivo diário, pela paciência e carinho que fizeram com que essa caminhada fosse mais leve e prazerosa; por dividir comigo os momentos da vida; por ser um exemplo de profissional e me ensinar tanto; e por suportar a distância e as barreiras que nos permitiram amadurecer em muitos aspectos da vida.

Aos Professores **Dr. João Pinheiro** e **Dra. Sueli Kataoka**, por terem me inserido no fantástico e deslumbrante mundo da ciência, me dando a oportunidade de realizar a iniciação científica em seu laboratório; por me darem a base necessária de conhecimento para que eu seguisse na trajetória acadêmica; e por me ensinarem a tratar tudo com muita dedicação e capricho.

Aos Professores da pós-graduação, **Prof. Dr. Alexandre Trivellato**, **Prof. Dr. Cássio Sverzut**, **Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi**, **Prof. Dr. Paulo Tambasco**, **Prof. Dr. Samuel Xavier**, **Prof^a. Dr^a. Selma Siéssere**, **Prof^a. Dr^a. Simone Regalo** e **Prof. Dr. Valdemar Barros** por todo aprendizado compartilhado nas disciplinas e clínicas de pós-graduação.

I would like to acknowledge and give my deepest gratitude to my research internship supervisors at Harvard School of Dental Medicine (HSDM) **Dr. Roland Baron** and **Dr. Francesca Gori** for their relentless support, guidance and advice carried me through all my stay in Boston. Their guidance was essential help me to be a better researcher.

I also would like to thank to my lab mates **Dhairya Raval**, **Dorothy Hu**, **Jun Zhou**, **Jiaming Zhang**, **Lama Alabdulaaly**, **Ruiying Chen**, **Shawn Berry** and **Shuang Liang**, for their continuous support, friendship and help me out in all aspects during my work at Baron-Gori Lab.

To my roomates **Alvaro Santo**, **Antonio Dias**, Cooper and Fletcher, my family in Boston, for their kindness and literally helping me feel at home in Boston, sharing moments and experiences abroad.

Ao **Marcos Viana** e **Steve Moran**, por toda ajuda durante o tempo que morei em Boston, me ajudando a superar as dificuldade previstas e permitindo que minha vida fosse muito melhor, confortável e mais “fácil” nos EUA.

Aos meus amigos **Helena** e **Gileade**, meus companheiros de pós-graduação presentes desde o dia que entrei na FORP, por sempre estarem dispostos a me orientar e ajudar nos experimentos e compartilharem comigo todas as experiências que a pós-graduação pode oferecer; por permitirem que eu fizesse parte da sua família, fazendo que eu amasse a **Catarina** como uma sobrinha.

Às amigas **Denise**, **Letícia** e **Maria Paula** pelo auxílio indispensável nos experimentos e pela amizade genuína e sincera construída desde suas iniciações científicas; pela agradável convivência durante o dia a dia no laboratório, nos momentos bons e ruins e pelos ensinamentos recíprocos que me ajudaram nessa longa trajetória.

À **Manu** e ao **Rogério** pela amizade e conversas descontraídas que permitiram que meus momentos em Ribeirão Preto fossem mais felizes. A ele, por ser um exemplo de coração bom e sincero. À ela por estar sempre disposta a me ajudar em tudo.

À **Fabíola Singaretti**, uma grande amiga que o laboratório me deu, conselheira e confidente, cuja ajuda nos experimentos de biologia molecular foi indispensável para a realização deste trabalho e cujos conselhos levarei para o resto da vida.

À **Adriana Almeida**, outra amiga que ganhei no laboratório, sempre gentil e disposta a ajudar, pelos momentos de descontração, por sempre me tratar com carinho e pelo exímio auxílio nos experimentos de microtomografia e histologia.

Ao **Roger Fernandes**, pela amizade, paciência e dedicação em todos os ensinamentos envolvendo cultura de células.

Aos **Gustavo de Sousa, Fabiana Rosseto e Julianne Vargas**, pelos ensinamentos nas cirurgias de animais, citometria de fluxo e bioluminescência, respectivamente.

Aos **alunos** de Iniciação Científica por permitirem que eu colaborasse com seus trabalhos, contribuindo para minha formação.

Aos demais **colegas** de laboratório e bancada pela companhia diária e compartilhamento de conhecimento.

Aos irmãos da Fraternidade Acadêmica Liberdade de Pensar, pelo apoio incondicional, especialmente ao **Lucas Blundi, Luis Guilherme e Rafael Raile** essenciais no meu desenvolvimento pessoal e moral e cuja amizade fez com que eu me tornasse uma pessoa melhor.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001, pelo apoio para a realização desse trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelas bolsas de pesquisa concedida no país, processo nº 2018/13290-0, e no exterior, processo nº 2019/08048-9, essenciais para a execução deste trabalho.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da **FAPESP** e da **CAPES**.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** e a **Universidade de São Paulo** pela oportunidade da realização da pós-graduação, infraestrutura e auxílio.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho e/ou participaram dos, até agora, melhores momentos da minha vida em Ribeirão Preto.

Muito obrigado de coração!

***“When I look back now
That summer seemed to last forever
And if I had the choice
Yeah, I'd always wanna be there
Those were the best days of my life!”***

Bryan Adams; Jim Vallance

RESUMO

RESUMO

SOUZA, ATP. **Efeitos das interações entre células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis e com osteoporose, diabetes mellitus ou hipertensão arterial na diferenciação osteoblástica e na regeneração de defeitos ósseos.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022. 244p.

O tecido ósseo ao ser lesionado apresenta grande capacidade de regeneração, que pode ser comprometida por algumas doenças sistêmicas como a osteoporose, diabetes mellitus (DM) e hipertensão arterial (HA). Uma alternativa promissora para tratar os danos causados ao reparo do tecido ósseo pela presença dessas doenças consiste no uso da terapia celular com células-tronco mesenquimais (MSC, do Inglês mesenchymal stem cells). No entanto, diversos aspectos necessitam ser investigados para avaliar a eficácia dessa terapia para a regeneração de defeitos ósseos nessas doenças. Nesse contexto, os objetivos desse estudo foram: 1) avaliar in vitro o efeito da osteoporose, DM ou HA sobre o tecido ósseo e diferenciação osteoblástica de MSC; 2) avaliar a influência de MSC de ratos saudáveis (SD-MSC) sobre a diferenciação osteoblástica de MSC de ratos com osteoporose (ORX-MSC), DM (DM-MSC) em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, ou HA (HA-MSC), e 3) avaliar in vivo o efeito de injeção local de SD-MSC para regenerar defeitos ósseos em calvária de ratos com osteoporose, DM ou HA. Para isso, as MSC foram isoladas a partir da medula óssea e avaliadas a proliferação celular, expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2*), osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), sialoproteína óssea (*Bsp*), osteocalcina (*Oc*), osteopontina (*Opn*) e β -catenina (*Ctnnb1*), expressão gênica de marcadores das vias de sinalização das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP, do Inglês bone morphogenetic proteins), Wingless/Integrated (WNT) e integrinas (ITG, do Inglês integrins), expressão proteica de ALP e OPN, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada. Em seguida, foram criados defeitos nas calvárias dos ratos com osteoporose, DM ou HA, e após 2 semanas foram injetadas SD-MSC ou veículo (PBS-Controle). A permanência das células nos defeitos ósseos foi avaliada por bioluminescência utilizando células expressando luciferase. Decorridas 4 semanas da injeção, a formação de tecido ósseo foi avaliada por microtomografia computadorizada, análise histológica e expressão gênica de marcadores osteoblásticos. Os dados foram submetidos ao teste t ou análise de variância, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). As doenças prejudicaram o tecido ósseo e diferenciação osteoblástica de MSC. As SD-MSC promoveram recuperação parcial da diferenciação osteoblástica de ORX-MSC, DM-MSC e HA-MSC enquanto

as ORX-MSC não prejudicaram a diferenciação de SD-MSC, as DM-MSC prejudicam pouco e as HA-MSC prejudicam ainda mais essa diferenciação. Nessas interações houve modulação de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG em diferentes graus. As SD-MSC permanecerem nos defeitos de todas as doenças e a terapia celular resultou em maior formação óssea comparada à injeção de PBS nos defeitos de animais com osteoporose e HA, mas não com DM. Os resultados desse estudo são relevantes para o desenvolvimento de terapia celular com vistas à regeneração do tecido ósseo em condições adversas como a osteoporose, DM ou HA.

Palavras-chave: célula-tronco mesenquimal, diabetes mellitus, hipertensão arterial, osso, osteoporose, terapia celular.

ABSTRACT

ABSTRACT

SOUZA, ATP. **Effects of interactions between mesenchymal stem cells from healthy rats and rats with osteoporosis, diabetes mellitus, or arterial hypertension on osteoblast differentiation and regeneration of bone defects.** Thesis (Doctor's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2022. 244f.

Bone tissue, when injured, has a great capacity for regeneration, which can be compromised by some systemic diseases such as osteoporosis, diabetes mellitus (DM), and arterial hypertension (AH). A promising alternative to treat the damage caused to the repair of bone tissue by the presence of these diseases is based on cell therapy with mesenchymal stem cells (MSC). However, several aspects need to be investigated to evaluate the effectiveness of this therapy for the regeneration of bone defects in these diseases. In this context, the aims of this study were: 1) to evaluate in vitro the effect of osteoporosis, DM, or HA on bone tissue and osteoblast differentiation of MSC; 2) to evaluate in vitro the influence of MSC from healthy rats (SD-MSC) on osteoblast differentiation of MSC from rats with osteoporosis (ORX-MSC), DM (DM-MSC) in normoglycemic or hyperglycemic medium, or HA (HA-MSC), and 3) to evaluate in vivo the effect of local injection of SD-MSC to regenerate bone defects in calvaria of rats with osteoporosis, DM or HA. For this, MSC were isolated from bone marrow to evaluate cell proliferation, gene expression of osteoblast markers runt-related transcription factor 2 (*Runx2*), osterix (*Osx*), alkaline phosphatase (*Alp*), bone sialoprotein (*Bsp*), osteocalcin (*Oc*), osteopontin (*Opn*) and β -catenin (*Ctnnb1*), gene expression of markers of BMP, WNT and ITG pathways, ALP and OPN protein expression, ALP activity and mineralized extracellular matrix formation. Then, defects were created in the calvaria of rats with osteoporosis, DM, or HA, and after 2 weeks SD-MSC or vehicle (PBS-Control) were injected. Cell permanence in bone defects was assessed by bioluminescence using cells expressing luciferase. Four weeks post-cell injection, bone tissue formation was evaluated by microcomputed tomography, histological analysis, and gene expression of osteoblast markers. Data were submitted to the t test or analysis of variance, and the significance level adopted was 5% ($p \leq 0.05$). The three diseases impaired bone tissue and osteoblast differentiation of MSC. SD-MSC promoted partial recovery of osteoblast differentiation of ORX-MSC, HA-MSC, and DM-MSC while ORX-MSC did not impair SD-MSC differentiation, DM-MSC partially impaired and HA-MSC impaired even more this differentiation. In these interactions, there was modulation of genes of bone morphogenetic proteins (BMP), Wingless/Integrated (WNT), and integrins (ITG) signaling pathways at different levels. The SD-MSC remained in the defects of all

diseases and the cell therapy resulted in higher bone formation compared to the injection of PBS in the defects of animals with osteoporosis and HA, but not with DM. The results of this study are relevant for developing cell therapy aimed at regenerating bone tissue in adverse conditions such as osteoporosis, DM, or HA.

Keywords: arterial hypertension, bone, cell therapy, diabetes mellitus, mesenchymal stem cell, osteoporosis.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cirurgia de orquiectomia bilateral para indução de osteoporose. A) Tricotomia e antissepsia. B) Incisão mediana na região anterior da bolsa escrotal. C) Divulsão. D) Exteriorização do testículo direito. E) Pinçamento dos funículos espermáticos. F) Ligadura. G) Secção na altura do canal deferente. H) Sutura final e testículos direito e esquerdo removidos..... **75**
- Figura 2.** Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e ORX-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico. As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos..... **80**
- Figura 3.** Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos nas calvárias. A) Tricotomia e antissepsia. B) Incisão anteroposterior. C) Exposição do tecido ósseo. D) Utilização de trefina. E) Defeito ósseo demarcado. F) Remoção do tecido ósseo. G) Defeito ósseo. H) Sutura..... **87**
- Figura 4.** Injeção local de células ou PBS nos defeitos ósseos nas calvárias. A) Aspecto após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos. B) Determinação dos defeitos ósseos por palpação e realização de injeção local..... **88**
- Figura 5.** Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos submetidos à cirurgia fictícia (SHAM; A e B) ou à cirurgia de orquiectomia bilateral (ORX; C e D) após 90 dias do procedimento cirúrgico..... **92**
- Figura 6.** Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) ou à cirurgia de orquiectomia bilateral (ORX), após 90 dias do procedimento cirúrgico. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=6)..... **93**
- Figura 7.** Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de SHAM-MSC e ORX-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=5; $p \leq 0,05$)..... **95**
- Figura 8.** Histogramas e porcentagem de SD-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I)..... **96**
- Figura 9.** Histogramas e porcentagem de ORX-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD45 (C), CD31 (D), CD34 (E), CD44 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I)..... **97**

Figura 10.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	98
Figura 11.	Expressão gênica relativa de <i>Runx2</i> (A), <i>Osx</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bsp</i> (D), <i>Oc</i> (E), <i>Opn</i> (F) e <i>Ctnnb1</i> (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).....	101
Figura 12.	Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	103
Figura 13.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	104
Figura 14.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	105
Figura 15.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	106
Figura 16.	Histogramas e porcentagem de SD-MSC expressando os marcadores de superfície para MHC classe I (A) e classe II (B), assim como células não incubadas com os anticorpos (C).....	108

Figura 17.	Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD-MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose. O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=6).....	109
Figura 18.	Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas.....	110
Figura 19.	Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=12).....	111
Figura 20.	Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. No centro dos defeitos tratados com células houve formação óssea. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cimento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e Eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cimento; cm: canal medular; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar; vs: vaso sanguíneo. Barra de escala: A e B = 800 μm ; C e D = 200 μm ; E e F: 50 μm	113
Figura 21.	Expressão gênica de Runx2 (A), Osx (B), Alp (C), Bsp (D), Oc (E) e Opn (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4).....	114
Figura 22.	Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e DM-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico normoglicêmico (A) ou hiperglicêmico (B). As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos.....	129

Figura 23.	Medidas dos níveis de glicose sanguínea de ratos tratados com STZ (DM) e veículo (NG). Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=12).....	133
Figura 24.	Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos normoglicêmicos (NG; A e B) e com diabetes mellitus (DM; C e D) após 42 dias da injeção intraperitoneal de veículo ou STZ, respectivamente.....	134
Figura 25.	Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos normoglicêmicos (NG) e com diabetes mellitus (DM) após 42 dias da injeção intraperitoneal de veículo ou STZ, respectivamente. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa (p≤0,05). Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=6).....	135
Figura 26.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de NG-MSC e DM-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	137
Figura 27.	Histogramas e porcentagem de DM-MSC cultivadas em meio de expansão normoglicêmico expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).....	138
Figura 28.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	139
Figura 29.	Expressão gênica relativa de <i>Runx2</i> (A), <i>Osx</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bsp</i> (D), <i>Oc</i> (E), <i>Opn</i> (F) e <i>Ctnnb1</i> (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).....	142
Figura 30.	Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	144

Figura 31.	Histogramas e porcentagem de DM-MSC cultivadas em meio de expansão hiperglicêmico expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).....	145
Figura 32.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	146
Figura 33.	Expressão gênica relativa de <i>Runx2</i> (A), <i>Osx</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bsp</i> (D), <i>Oc</i> (E), <i>Opn</i> (F) e <i>Ctnnb1</i> (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).....	149
Figura 34.	Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	151
Figura 35.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	152
Figura 36.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	153

- Figura 37.** Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre DM- MSC→DM- MSC, SD- MSC→DM- MSC e DM- MSC→SD- MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD- MSC→SD- MSC..... **154**
- Figura 38.** Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre DM- MSC→DM- MSC, SD- MSC→DM- MSC e DM- MSC→SD- MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD- MSC→SD- MSC..... **156**
- Figura 39.** Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre DM- MSC→DM- MSC, SD- MSC→DM- MSC e DM- MSC→SD- MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD- MSC→SD- MSC..... **157**
- Figura 40.** Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre DM- MSC→DM- MSC, SD- MSC→DM- MSC e DM- MSC→SD- MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD- MSC→SD- MSC..... **158**
- Figura 41.** Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD- MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus (DM). O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=6)..... **161**
- Figura 42.** Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD- MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas..... **162**

Figura 43.	Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12, p \leq 0,05).....	163
Figura 44.	Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cimento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e Eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cimento; cm: canal medular; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar. Barra de escala: A e B = 800 μ m; C e D = 200 μ m; E e F: 50 μ m.....	164
Figura 45.	Expressão gênica de Runx2 (A), Osx (B), Alp (C), Bsp (D), Oc (E) e Opn (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com diabetes mellitus, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa (p \leq 0,05). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=4).....	165
Figura 46.	Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e HA-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico. As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos.....	179
Figura 47.	Medidas da pressão arterial sistólica de ratos Wistar (NT) e SHR (HA). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12).....	182
Figura 48.	Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos normotensos (NT; A e B) e com hipertensão arterial (HA; C e D), após 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida.....	183
Figura 49.	Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos normotensos (NT) ou ratos com hipertensão arterial (HA), após 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida dos animais. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa (p \leq 0,05). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=6).....	184
Figura 50.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de NT-MSC e HA-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=5; p \leq 0,05).....	186

Figura 51.	Histogramas e porcentagem de HA-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD45 (C), CD31 (D), CD34 (E), CD44 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).....	187
Figura 52.	Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	188
Figura 53.	Expressão gênica relativa de <i>Runx2</i> (A), <i>Osx</i> (B), <i>Alp</i> (C), <i>Bsp</i> (D), <i>Oc</i> (E), <i>Opn</i> (F) e <i>Ctnnb1</i> (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).....	191
Figura 54.	Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).....	193
Figura 55.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	194
Figura 56.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	195
Figura 57.	Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	196

- Figura 58.** Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD-MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial (HA). O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=6)..... 199
- Figura 59.** Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas..... 200
- Figura 60.** Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12)..... 201
- Figura 61.** Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. No centro dos defeitos tratados com células houve formação óssea. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cimento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cimento; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar. Barra de escala: A e B = 800 μm ; C e D = 200 μm ; E e F: 50 μm 203
- Figura 62.** Expressão gênica de Runx2 (A), Osx (B), Alp (C), Bsp (D), Oc (E) e Opn (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=4)..... 204

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de primers para PCR em tempo real.....	82
Tabela 2.	Sondas Taqman para PCR Array.....	85
Tabela 3.	Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre ORX-MSC →ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	107
Tabela 4.	Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	155
Tabela 5.	Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	159
Tabela 6.	Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.....	197

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	57
OBJETIVO GERAL	67
CAPÍTULO 1	71
EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM OSTEOPOROSE NA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS	
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
1.2.1 Animais.....	73
1.2.2 Indução da osteoporose.....	74
1.2.2.1 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com osteoporose e SHAM.....	75
1.2.3 Efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC.....	76
1.2.3.1 Obtenção e cultura de SHAM-MSC e ORX-MSC	76
1.2.3.2 Diferenciação osteoblástica de SHAM-MSC e ORX-MSC.....	76
1.2.3.2.1 Proliferação de SHAM-MSC e ORX-MSC	77
1.2.3.2.2 Atividade de ALP em SHAM-MSC e ORX-MSC.....	77
1.2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por SHAM-MSC e ORX-MSC..	78
1.2.4 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de ORX-MSC e de ORX-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC	79
1.2.4.1 Obtenção e cultura de SD-MSC e ORX-MSC	79
1.2.4.1.1 Caracterização de SD-MSC e ORX-MSC por citometria de fluxo.....	79
1.2.4.2 Cocultura indireta de SD-MSC e ORX-MSC e diferenciação osteoblástica.....	80
1.2.4.3 Proliferação de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	81
1.2.4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta	81
1.2.4.5 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	82
1.2.4.6 Atividade de ALP em SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta	83
1.2.4.7 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	84
1.2.4.8 Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta	84

1.2.5 Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose.....	86
1.2.5.1 Obtenção e cultura de SD-MSC.....	86
1.2.5.1.1 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC	86
1.2.5.2 Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos	87
1.2.5.3 Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos.....	88
1.2.5.4 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose.....	88
1.2.5.5 Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com osteoporose	89
1.2.5.6 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose.....	90
1.2.5.7 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose	90
1.2.5.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose	90
1.2.6 Análise estatística.....	91
1.3 RESULTADOS	91
1.3.1 Efeito da osteoporose no tecido ósseo.....	91
1.3.2 Efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC.....	94
1.3.2.1 Proliferação de SHAM-MSC e ORX-MSC	94
1.3.2.2 Atividade de ALP em SHAM-MSC e ORX-MSC.....	94
1.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por SHAM-MSC e ORX-MSC.....	94
1.3.3 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de ORX-MSC e de ORX-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC	95
1.3.3.1 Caracterização de SD-MSC e ORX-MSC por citometria de fluxo	95
1.3.3.2 Proliferação de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	97
1.3.3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta	98
1.3.3.4 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	102
1.3.3.5 Atividade de ALP em SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta	102
1.3.3.6 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta.....	102

1.3.3.7 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e ORX-MSC.....	103
1.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose	108
1.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC	108
1.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose	108
1.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose.....	109
1.3.4.4 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose	111
1.3.4.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose.....	114
1.4 DISCUSSÃO	115
1.5 CONCLUSÕES.....	121
CAPÍTULO 2.....	123
EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM DIABETES MELLITUS NA DIFERENCIAÇÃO OSTEUBLÁSTICA E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS	
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	125
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
2.2.1 Animais.....	125
2.2.2 Indução da diabetes mellitus	126
2.2.2.1 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com diabetes mellitus e normoglicêmicos.....	126
2.2.3 Efeito da diabetes mellitus sobre a diferenciação osteoblástica de MSC	126
2.2.3.1 Obtenção e cultura de NG-MSC e DM-MSC.....	126
2.2.3.2 Diferenciação osteoblástica de NG-MSC e DM-MSC	127
2.2.3.2.1 Proliferação de NG-MSC e DM-MSC	127
2.2.3.2.2 Atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC.....	127
2.2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC.....	127
2.2.4 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de DM-MSC e de DM-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC	128
2.2.4.1 Obtenção e cultura de SD-MSC e DM-MSC	128
2.2.4.1.1 Caracterização de DM-MSC por citometria de fluxo.....	128

2.2.4.2 Cocultura indireta de SD-MSC e DM-MSC e diferenciação osteoblástica.....	128
2.2.4.3 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta	129
2.2.4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta	130
2.2.4.5 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta.....	130
2.2.4.6 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta.....	130
2.2.4.7 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta.....	130
2.2.4.8 Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta	130
2.2.5 Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus	131
2.2.5.1 Obtenção e cultura de SD-MSC.....	131
2.2.5.1.1 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC	131
2.2.5.2 Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos	131
2.2.5.3 Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos.....	131
2.2.5.4 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus	131
2.2.5.5 Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com diabetes mellitus.....	132
2.2.5.6 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus	132
2.2.5.7 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus.....	132
2.2.5.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus.....	132
2.2.6 Análise estatística	133
2.3 RESULTADOS	133
2.3.1 Efeito da diabetes mellitus no tecido ósseo	133
2.3.2 Efeito da diabetes mellitus sobre a diferenciação osteoblástica de MSC	136
2.3.2.1 Proliferação de NG-MSC e DM-MSC	136
2.3.2.2 Atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC.....	136
2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC.....	136

2.3.3 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de DM-MSC e de DM-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC cultivadas em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico	137
2.3.3.1 Caracterização de DM-MSC cultivadas em meio normoglicêmico por citometria de fluxo.....	137
2.3.3.2 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico.....	138
2.3.3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico..	139
2.3.3.4 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico	143
2.3.3.5 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico.....	143
2.3.3.6 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico	143
2.3.3.7 Caracterização de DM-MSC cultivadas em meio hiperglicêmico por citometria de fluxo.....	144
2.3.3.8 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico	145
2.3.3.9 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico	146
2.3.3.10 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico.....	150
2.3.3.11 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico	150
2.3.3.12 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico.....	150
2.3.3.13 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e DM-MSC cultivadas em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico	151
2.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus	160
2.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC	160
2.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus	160
2.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus.....	161

2.3.4.4	<i>Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus</i>	163
2.3.4.5	<i>Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus</i>	165
2.4	DISCUSSÃO	166
2.5	CONCLUSÕES	171
CAPÍTULO 3	173
EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM HIPERTENSÃO ARTERIAL NA DIFERENCIAÇÃO OSTEUBLÁSTICA E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS		
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	175
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	175
3.2.1	<i>Animais</i>	175
3.2.2	<i>Desenvolvimento da hipertensão arterial</i>	176
3.2.2.1	<i>Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com hipertensão arterial e normotensos</i>	176
3.2.3	<i>Efeito da hipertensão arterial sobre a diferenciação osteoblástica de MSC</i>	176
3.2.3.1	<i>Obtenção e cultura de NT-MSc e HA-MSc</i>	176
3.2.3.2	<i>Diferenciação osteoblástica de NT-MSc e HA-MSc</i>	177
3.2.3.2.1	<i>Proliferação de NT-MSc e HA-MSc</i>	177
3.2.3.2.2	<i>Atividade de ALP em NT-MSc e HA-MSc</i>	177
3.2.3.2.3	<i>Formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSc e HA-MSc</i>	177
3.2.4	<i>Efeito de SD-MSc na diferenciação osteoblástica de HA-MSc e de HA-MSc na diferenciação osteoblástica de SD-MSc</i>	178
3.2.4.1	<i>Obtenção e cultura de SD-MSc e HA-MSc</i>	178
3.2.4.1.1	<i>Caracterização de HA-MSc por citometria de fluxo</i>	178
3.2.4.2	<i>Cocultura indireta de SD-MSc e HA-MSc e diferenciação osteoblástica</i>	178
3.2.4.3	<i>Proliferação de SD-MSc e HA-MSc em cocultura indireta</i>	179
3.2.4.4	<i>Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSc e HA-MSc em cocultura indireta</i>	179
3.2.4.5	<i>Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSc e HA-MSc em cocultura indireta</i>	179
3.2.4.6	<i>Atividade de ALP em SD-MSc e HA-MSc em cocultura indireta</i>	179
3.2.4.7	<i>Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSc e HA-MSc em cocultura indireta</i>	179

3.2.4.8	Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta.....	180
3.2.5	Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	180
3.2.5.1	Obtenção e cultura de SD-MSC.....	180
3.2.5.1.1	Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC	180
3.2.5.2	Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos	180
3.2.5.3	Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos	180
3.2.5.4	Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	181
3.2.5.5	Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com hipertensão arterial.....	181
3.2.5.6	Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	181
3.2.5.7	Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	181
3.2.5.8	Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	181
3.2.6	Análise estatística.....	182
3.3.1	Efeito da hipertensão arterial no tecido ósseo	182
3.3.2	Efeito da hipertensão arterial sobre a diferenciação osteoblástica de MSC	185
3.3.2.1	Proliferação de NT-MSC e HA-MSC	185
3.3.2.2	Atividade de ALP em NT-MSC e HA-MSC.....	185
3.3.2.3	Formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSC e HA-MSC.....	185
3.3.3	Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de HA-MSC e de HA-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC.....	186
3.3.3.1	Caracterização de HA-MSC por citometria de fluxo	186
3.3.3.2	Proliferação de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta	187
3.3.3.3	Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta.....	188
3.3.3.4	Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta.....	192
3.3.3.5	Atividade de ALP em SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta.....	192
3.3.3.6	Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta.....	192

3.3.3.7 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e HA-MSC	193
3.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	198
3.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC	198
3.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	198
3.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	199
3.3.4.4 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	201
3.3.4.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial.....	204
3.4 DISCUSSÃO	205
3.5 CONCLUSÕES	209
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	211
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	215
ANEXOS	235
ANEXO A.....	237
ANEXO B.....	238

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo que exerce funções importantes no corpo, como locomoção, suporte e proteção dos tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato e abrigo da medula óssea, que também atua como órgão endócrino regulador do metabolismo de energia e reprodução. Apesar de sua aparência inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico que é continuamente reabsorvido pelos osteoclastos e formado pelos osteoblastos, enquanto os osteócitos atuam como mecanossensores e orquestradores desse processo de remodelação (FLORENCIO-SILVA et al., 2014; BUCK; DUMANIAN, 2012). O tecido ósseo é reconhecido por sua capacidade regenerativa resultante de reações locais e sistêmicas que restauram sua função normal após uma lesão traumática ou perdas por processos infecciosos e/ou neoplásicos (BRYDONE et al., 2010). Contudo, esse processo nem sempre é bem-sucedido e em aproximadamente 5% a 10% das fraturas estão associadas ao reparo ósseo prejudicado, incluindo a não união (PANTELI et al., 2015; HAK et al., 2014; GIORGIO CALORI et al., 2013). Esta resulta em resultados prejudiciais para o paciente, exigindo um tratamento complexo, longo e com altos custos, e frequentemente associado a morbidades (ANDRZEJOWSKI; GIANNOUDIS, 2019; ZURA et al., 2015; DAHABREH et al., 2014; HANKENSON; ZIMMERMAN; MARCUCIO; 2014).

Na prática clínica, a reparação óssea é ainda mais prejudicada na presença de alterações sistêmicas (KHAN et al., 2005). Dentre as doenças sistêmicas que atuam de maneira negativa no tecido ósseo e que acometem parcela importante da população mundial destacam-se a osteoporose, a diabetes mellitus (DM) e a hipertensão arterial (HA). As três, por mecanismos diferentes, aumentam o risco e o número de fraturas, prejudicam o processo de reparo ósseo e afetam a qualidade de vida das pessoas acometidas por essas doenças (CAMPBELL et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021; HAMADA et al., 2009; VESTERGAARD, 2007; VON WOWERN et al., 2001, CAPPUCIO et al., 1999).

A osteoporose é a doença metabólica óssea mais comum, causada por vários fatores. Essa doença é caracterizada por uma diminuição da taxa de formação e um processo contínuo de reabsorção óssea, levando à redução da densidade e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo (LI et al., 2015; WANG

et al., 2013; MCCABE, 2007; ERBEN, 2001). Os ossos se tornam mais porosos, gerando fragilidade e aumentando o risco de fraturas. A perda óssea ocorre silenciosa e progressivamente ao longo do tempo e muitas vezes não há nenhum indício ou sintoma até que ocorra a primeira fratura (INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2019; KRAHE, 2003; SANFILIPPO; BIANCHI, 2003; VON WOWERN, 2001; MANOLAGAS; JILKA, 1995). Segundo a International Osteoporosis Foundation (2019), a partir dos 50 anos, 1 em cada 3 mulheres e 1 em cada 5 homens sofrerão pelo menos uma fratura em decorrência da osteoporose durante o restante de suas vidas.

Devido à menor prevalência nos homens, a osteoporose é mais estudada em mulheres; porém, nos últimos anos, em virtude de sua gravidade e das consequências para a saúde dos pacientes do sexo masculino, a osteoporose nesses indivíduos também se tornou um problema de saúde mundial (HANEY; BLIZIOTES, 2008). Nos homens, o risco de fraturas em decorrência da osteoporose é de 27%, maior do que o risco de desenvolvimento de câncer de próstata que é de 11,3% (COOLEY; JONES, 2001; MERRILL et al., 1997). No Brasil, a prevalência de fraturas por fragilidade óssea, em decorrência da osteoporose, entre homens com 40 anos ou mais é de 12,8% e o número de homens que sofrem fraturas de quadril é de 24,2 mil por ano (INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2019; PINHEIRO et al., 2009).

A DM é uma doença metabólica crônica que resulta em altos níveis de glicose no plasma sanguíneo devido a uma deficiência na secreção de insulina pelo pâncreas, na ação da insulina ou ambas. A maioria dos casos pode ser classificada em dois grupos: DM tipos 1 e 2. Esta última corresponde a 95% dos casos de DM e é causada por fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores ambientais associados, estão o sedentarismo e dietas ricas em gorduras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2022; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2022). Muito em função desses fatores, a prevalência de DM no mundo está aumentando. De acordo com a International Diabetes Federation (2021) essa doença pode ser considerada um dos maiores problemas de saúde global no século XXI. No Brasil, aproximadamente 12,5 milhões de pessoas são afetadas. No mundo, além dos estimados 425 milhões de adultos que atualmente têm DM, há outros milhares com tolerância à glicose prejudicada, o que os coloca em alto risco de desenvolver a doença no futuro. Em 2045, está previsto que o número de pessoas com DM

aumente para 693 milhões, ou seja, 1 em cada 10 pessoas. Em relação ao gênero, há cerca de 17,1 milhões de homens a mais do que mulheres com DM (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Dentre as várias complicações associadas à DM, está o prejuízo à regeneração óssea, o que diminui a densidade mineral óssea, aumenta o risco de fraturas e ocasiona várias desordens do sistema esquelético (KALAITZOGLOU et al., 2016; JANGHORBANI et al., 2007). De fato, o risco de fraturas em pacientes com DM é aproximadamente 5 a 7 vezes maior do que em pessoas não afetadas pela doença (YATURU, 2009; DUARTE et al., 2005). Estudo in vitro usando osteoblastos primários humanos, mostrou o efeito adverso da hiperglicemia na função osteoblástica, onde os níveis elevados de glicose resultaram em redução da função das células osteoblásticas (LEVINGER et al., 2016). Além disso, a hiperglicemia crônica diminui a proliferação e função dos osteoblastos, prejudicando assim a formação da matriz óssea (JAVED; ROMANOS, 2009; GERDHEM et al., 2005; VERHAEGHE et al., 1989).

A HA é considerada uma desordem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e demográficos, e constitui um dos desafios mais importantes para a saúde em todo o mundo. A pressão arterial normal do adulto é considerada <130 mmHg quando o coração contrai (sistólica) e <80 mmHg quando o coração relaxa (diastólica). Acima desses valores, a pressão arterial, pode ser considerada elevada ou alta (BARROSO et al., 2021; WHELTON et al., 2018). Dados mostram que 1 em cada 5 adultos são acometidos por essa desordem e as complicações decorrentes da HA ocasionam 9,4 milhões de mortes no mundo a cada ano (CAMPBELL et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Até 2025, estima-se que mais de 1,5 bilhão de pessoas terá HA (WORLD HEART FEDERATION, 2022). No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) através da Pesquisa Nacional de Saúde (2019), a prevalência de HA considerando indivíduos com 18 anos ou mais foi de 23,9% em 2019, aproximadamente 38,1 milhões de pessoas, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares.

Além de ser a causa evitável mais importante de doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais em todo o mundo, estudos clínicos em pacientes hipertensos demonstraram que a pressão arterial elevada tem sido associada à redução da densidade mineral óssea e conseqüentemente a um risco aumentado de

fraturas (HONG et al., 2019; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001; CAPPuccio et al., 1999). A HA leva ao baixo turnover ósseo, o que pode ser um dos mecanismos da redução na massa óssea cortical e trabecular relacionada à esta doença (HU et al., 2021; BASTOS et al., 2010; FAZAN et al., 2006; WANG et al., 1993; BARBAGALLO et al., 1991; IZAWA et al., 1985).

Ao longo do tempo, uma série de medicamentos foi aprovada para a prevenção e/ou tratamento da osteoporose, DM e HA, assim como diversas terapias têm sido propostas para o tratamento das fraturas, que constituem uma das complicações destas doenças. Dessa forma, é importante ter uma visão abrangente, não somente para as terapias existentes, como também para a investigação de novas possibilidades terapêuticas objetivando a resolução de fraturas nos pacientes acometidos por esses problemas sistêmicos (TABATABAEI-MALAZY et al., 2017; INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2019). Nesse contexto, um método promissor para promover a regeneração óssea, envolve a utilização de terapia celular a partir de células-tronco mesenquimais (MSC, do Inglês mesenchymal stem cells) (BHARDWAJ; DEVI; MANDAL, 2015; MAKRIS et al., 2015), já que vários estudos têm mostrado os benefícios de MSC no tratamento de diversas doenças, como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e doenças cardiovasculares (KIM; CHO, 2015; ZAHER et al., 2014; EGGENHOFER et al., 2014).

As MSC são células indiferenciadas capazes de autorrenovação, com alta taxa proliferativa e capacidade de diferenciação em células de diversos tecidos, inclusive o osso (SICCHIERI et al., 2012; BELOTI et al., 2012; DING; SHYU; LIN, 2011; AUGELLO; KURTH; DE BARI, 2010; SENSEBÉ; BOURIN, 2009; ANJOS-AFONSO; SIAPATI; BONNET, 2004; PITTENGER et al., 1999). Dentre as MSC, as derivadas da medula óssea são a fonte mais utilizada em estudos de regeneração óssea devido à suas maiores propriedades osteogênicas em comparação a outras fontes de MSC (FIDELES et al., 2019; MASHIMO et al., 2019). Sendo assim, essas células poderiam favorecer a regeneração óssea, ao menos em parte, por se diferenciarem em osteoblastos, as células responsáveis pela formação do tecido ósseo (JIANG, 2012; MAUNEY; VOLLOCH; KAPLAN, 2005).

As características das MSC, que as tornam terapeuticamente relevantes, podem ser alteradas pela osteoporose, DM e HA. Foi demonstrado que cada uma dessas doenças afeta negativamente a diferenciação osteoblástica de MSC, com

consequente redução do seu potencial osteogênico (MANRIQUE et al., 2015; QIAN et al., 2015; CURSINO, 2014; RODRÍGUEZ et al., 1999). Portanto, a terapia celular com vistas à regeneração óssea nestas condições sistêmicas, deve priorizar o uso de células obtidas de um ambiente saudável.

Há evidências que indicam que os efeitos terapêuticos das MSC na terapia celular se devem, entre outras coisas, à sua capacidade de modificar o microambiente do hospedeiro e suas células, além da sua capacidade de diferenciação e incorporação ao tecido do hospedeiro (SHAO; ZHANG; YANG, 2015). Neste contexto, é relevante entender como se dá a interação entre MSC saudáveis e aquelas encontradas em ambiente de osteoporose, de DM ou de HA, principalmente no que se refere à diferenciação osteoblástica das MSC. Para tanto, o uso de modelo de cocultura indireta se mostra adequado porque possibilita a interação entre as células e ao mesmo tempo avaliá-las separadamente e determinar os mecanismos celulares relacionados à diferenciação osteoblástica que poderiam estar envolvidos na interação entre as MSC. Dentre estes mecanismos está envolvido a modulação de genes das vias de sinalização das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP, do Inglês bone morphogenetic proteins), Wingless/Integrated (WNT) e integrinas (ITG, do Inglês integrins), as quais participam ativamente do processo de osteogênese e diferenciação osteoblástica (BRUNNER et al., 2018; SONG et al., 2018; YUAN et al., 2018).

As BMP agem em células ósseas principalmente através da via canônica dependente de *Caenorhabditis elegans* Sma genes e *Drosophila* Mad, Mothers against decapentaplegic (Smad) ligando-se a complexos heterodiméricos compostos por receptores tipo I e tipo II, que por sua vez promovem a fosforilação de proteína Smad1/5/8. Essa Smad forma um complexo com Smad4, o qual é translocado para o núcleo e atua como fator de transcrição induzindo a expressão de genes-alvos das BMP (NICKEL; MUELLER, 2019). Na via canônica de sinalização WNT, os ligantes WNT ligam-se aos receptores frizzled (Fzd) e aos co-receptores low-density lipoprotein receptor-related protein 5 e 6 (Lrp5/6), que após sua fosforilação ligam-se à proteína Axin, formando um complexo com outras proteínas. Esse complexo inibe a atividade da glycogen synthase kinase 3 beta (Gsk3 β) e consequentemente a fosforilação e degradação de β -catenina. Uma vez estabilizada, a β -catenina não fosforilada transloca-se para o núcleo, onde regula os fatores de transcrição da família T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef)

(CLEVERS; NUSSE, 2012). A função das ITG é regulada através de múltiplos mecanismos, incluindo mudanças conformacionais e interações proteína-proteína. A interação não covalente estável entre 18 subunidades α e 8 subunidades β gera 24 heterodímeros de ITG funcionalmente distintos, a maioria dos quais contém a subunidade beta1. Enquanto algumas ITG, como alfa5beta1, interagem com um número limitado de ligantes da matriz extracelular, outras, como alfavbeta3 e alfa4beta1, possuem vários. Além disso, o mesmo ligante de matriz extracelular pode ser envolvido com diferentes ITG e ativar vias alternativas de sinalização como as de BMP e WNT. Assim, a resposta biológica a estímulos ambientais é fortemente influenciada por quais ITG são expressas e ativas na membrana plasmática (MORENO-LAYSECA et al., 2019).

Recentemente foi avaliada a viabilidade da terapia celular no reparo de defeitos ósseos de calvária de ratos saudáveis (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). O modelo experimental envolveu a criação de defeitos de 5 mm de diâmetro em calvárias de ratos que receberam injeção única de veículo (solução salina tamponada com fosfato, PBS) ou de MSC isoladas a partir da medula óssea ou tecido adiposo de ratos, 2 semanas após a criação dos mesmos, com uma concentração de 5×10^6 células, as quais ficaram concentradas no local da injeção por até 12 dias. Quatro semanas após a injeção (6 semanas após a criação do defeito), os animais foram mortos e as calvárias removidas para análises da formação de tecido ósseo. Enquanto os animais que receberam injeção de PBS apresentaram formação óssea reduzida, os animais que receberam a injeção de MSC exibiram expressiva formação óssea; no entanto, sem ainda apresentar a regeneração do defeito. De forma semelhante, a utilização de osteoblastos isolados da calvária de ratos recém-nascidos ou MSC do ligamento periodontal de humanos também não promoveram a regeneração, apesar de aumentar a formação óssea (ADOLPHO et al., 2022; SOUZA et al., 2018). Os resultados desses estudos indicam que o modelo experimental utilizado é adequado à execução em ratos com osteoporose, DM ou HA.

Com base na capacidade de MSC para reparar o tecido ósseo, no efeito prejudicial dessas doenças sobre a diferenciação de MSC e na exploração ainda incipiente da interação entre MSC obtidas de um modelo saudável e MSC obtidas de modelos com as condições sistêmicas aqui descritas, formulamos as seguintes hipóteses: 1) a interação entre MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos

saudáveis e MSC derivadas de medula óssea de ratos com osteoporose, DM ou HA modula genes das vias de sinalização celular específicas e, conseqüentemente, afeta a diferenciação osteoblástica de ambas as populações de MSC, saudáveis e doentes, quando crescidas em condições osteogênicas e 2) MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos saudáveis podem favorecer, in vivo, o reparo de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com osteoporose, DM ou HA.

O presente estudo pode contribuir futuramente para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para tratar alterações ósseas nos pacientes acometidos por essas doenças, já que fraturas em virtude da osteoporose, DM ou HA, constituem um problema de saúde global (CAMPBELL et al., 2022; BARROSO et al., 2021; WORLD HEART FEDERATION, 2022; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021; INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021; VESTERGAARD; REJNMARK; MOSEKILDE, 2009; YATURU, 2009; DUARTE et al., 2005).

OBJETIVO GERAL

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial da terapia celular através de injeção local de células-tronco mesenquimais para regenerar o tecido ósseo em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose, DM ou HA.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 – EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM OSTEOPOROSE NA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar in vivo o efeito da osteoporose sobre o tecido ósseo.
- Avaliar in vitro o efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC.
- Avaliar in vitro a influência de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos saudáveis jovens (SD-MSc) sobre a diferenciação osteoblástica de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos com osteoporose (ORX-MSc), e destas sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSc, crescidas em condições osteogênicas, utilizando um modelo de cocultura indireta.
- Avaliar in vivo o efeito de injeção local de SD-MSc para regenerar o tecido ósseo de ratos com osteoporose, utilizando um modelo de defeito ósseo criado em calvária.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) aprovou todos os procedimentos realizados com animais neste trabalho, sob o protocolo nº 2018.1.30.58.8 (Anexo A). Para os experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com aproximadamente 150-200 g e 4 semanas de vida. O número e a distribuição de animais seguiram a descrição abaixo:

- 52 ratos para indução da osteoporose através da cirurgia de orquiectomia (ORX), dos quais: 6 animais foram utilizados para confirmar o efeito da osteoporose no tecido ósseo; 14 animais foram utilizados para obtenção e cultura de ORX-MSc; e 32 animais foram utilizados nos experimentos in vivo.
- 47 ratos para cirurgia fictícia (SHAM), dos quais: 6 foram utilizados como Controle para confirmar o efeito da osteoporose no tecido ósseo, 6 foram utilizados para

obtenção e cultura de MSC isoladas a partir da medula óssea (SHAM-MSC), 15 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSC utilizadas nos experimentos de cocultura indireta e 20 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSC para injeção local nos defeitos ósseos criados nos ratos com osteoporose.

1.2.2 Indução da osteoporose

A osteoporose foi induzida através da cirurgia de orquiectomia bilateral (Figura 1). Para isso, os animais foram anestesiados através de injeção peritoneal com solução anestésica de xilazina (Coopazine, Agibrands, Brasil) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - e ketamina (Dopalen, Agibrands) - anestésico geral - na proporção de 6 mg/kg de peso corporal de xilazina e 75 mg/kg de peso corporal de ketamina. Foi também realizada analgesia pré-operatória com 2,5 mg/kg de flunixin meglumina (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Em seguida, foi realizada tricotomia e antissepsia com solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% (Riohex, Rioquímica, Brasil) na região escrotal e a orquiectomia foi realizada conforme técnica descrita por Zarrow et al. (1964), onde uma incisão mediana foi feita na região anterior da bolsa escrotal, seguida de abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Posteriormente, os funículos espermáticos foram ligados com fio de seda 4-0 (Ethicon, Brasil) e seccionados na altura do canal deferente. Os testículos e os epidídimos foram então removidos e a pele da bolsa escrotal suturada com fio mononylon 4-0 (Ethicon). Como Controle, 6 animais foram submetidos à cirurgia fictícia de orquiectomia (SHAM), através de incisão na bolsa escrotal com exposição dos testículos seguida de sutura. Ao fim dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram medicados com dose única de flunixin meglumina (10 mg/100 g de peso corporal) (Schering-Plough) e dose única de solução de antibióticos contendo benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério em número de 3 por caixa por 90 dias, após os quais o tecido ósseo está afetado pela doença (CHIN; IMA-NIRWANA, 2015). Durante esse período, os animais receberam ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

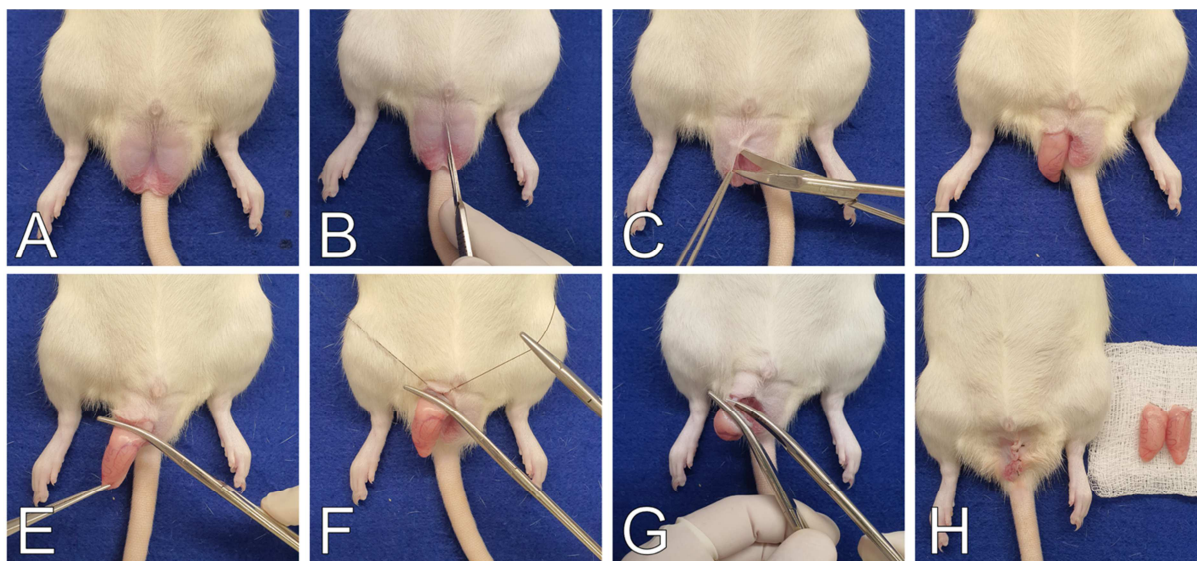


Figura 1. Cirurgia de orquiectomia bilateral para indução de osteoporose. A) Tricotomia e antisepsia. B) Incisão mediana na região anterior da bolsa escrotal. C) Divulsão. D) Exteriorização do testículo direito. E) Pinçamento dos funículos espermáticos. F) Ligadura. G) Secção na altura do canal deferente. H) Sutura final e testículos direito e esquerdo removidos.

1.2.2.1 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com osteoporose e SHAM

Ao final de 90 dias após os procedimentos cirúrgicos, foi realizada a eutanásia dos animais ORX e SHAM com dose excessiva de tiopental sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) na dosagem de 100-120 mg/Kg associado à lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Brasil) na dosagem de 1 mg/Kg, via intraperitoneal. Em seguida, os fêmures foram removidos e submersos em solução de formol tamponado 10% (pH=7) (Merck, Alemanha) por 48 horas para fixação tecidual. Após esse período, os fêmures foram escaneados no microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker, Bélgica). O escaneamento de alta resolução foi realizado através da fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixels com resolução de até 1 μ m. Ao final, o software NRecon (versão 1.15.4.0, Bruker) foi utilizado para obtenção de projeções tomográficas bidimensionais (2D) e reconstruções tomográficas tridimensionais (3D). Por sua vez, o software CT Analyser (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker) foi utilizado para realizar a análise morfométrica e obtenção dos seguintes parâmetros: volume ósseo (BV, do Inglês bone volume), volume ósseo/volume total (BV/TV, do Inglês bone volume/total volume), superfície óssea (BS, do Inglês bone surface), espessura trabecular (Tb.Th, do Inglês trabecular thickness), número trabecular (Tb.N, do Inglês trabecular number), separação trabecular (Tb.Sp, do Inglês trabecular separation), densidade de conectividade (Conn.D, do Inglês connectivity density) e densidade mineral óssea (BMD, do Inglês bone mineral density).

1.2.3 Efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

1.2.3.1 Obtenção e cultura de SHAM-MSC e ORX-MSC

Para avaliar o efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC, SHAM-MSC e ORX-MSC foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos SHAM e ORX, respectivamente. A eutanásia dos animais foi realizada como descrito no item 1.2.2.1 e os fêmures foram retirados e transportados em solução contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA), 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). Os fêmures foram levados ao fluxo laminar e realizada antissepsia sequencial com álcool 70% e solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% (Riohex, Rioquímica) durante 1 minuto durante o qual foram removidos os tecidos moles remanescentes. Em seguida, as epífises foram cortadas e o canal medular exposto foi irrigado copiosamente com meio de expansão celular para extração da medula óssea de seu interior. O meio de expansão é composto por α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). As medulas ósseas de ratos SHAM e ORX foram transferidas separadamente para frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) para cultura de SHAM-MSC e ORX-MSC, respectivamente. O cultivo foi realizado durante 7 dias para permitir a seleção de MSC por aderência ao poliestireno e obtenção de células em número suficiente para a realização dos experimentos. Durante esse período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

1.2.3.2 Diferenciação osteoblástica de SHAM-MSC e ORX-MSC

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e as células aderidas foram desprendidas pela ação de uma solução contendo tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), 1,3 mg/mL de colagenase do tipo II (Gibco-Life Technologies) e EDTA 1 mM (Gibco-Life Technologies), o que permitiu a obtenção de uma suspensão de células. Em seguida, SHAM-MSC e ORX-MSC foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços contendo meio de expansão na densidade de 10⁴ células/poço. Após 2

dias, tempo necessário para aderência celular, o meio de expansão foi substituído por meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica e as células foram cultivadas por até 17 dias. O meio osteogênico é composto por meio de expansão suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerolfosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). Durante a diferenciação osteoblástica, as respostas celulares avaliadas foram: proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz extracelular mineralizada. As células foram mantidas e o meio de cultura foi trocado nas mesmas condições como descrito no item 1.2.3.1.

1.2.3.2.1 Proliferação de SHAM-MSC e ORX-MSC

A proliferação celular foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cultura pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. O MTT avalia as células viáveis metabolicamente ativas através da atividade de desidrogenases mitocondriais. A redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) em cristais de formazan (de cor púrpura) por essas enzimas é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à viabilidade celular (Mosmann, 1983). Para este ensaio, o meio de cultura foi removido dos poços e estes foram lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecido previamente a 37°C, preenchidos com 1 mL de solução contendo meio de cultura e MTT 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C durante 4 horas. Após esse período, a solução foi removida e os cristais aparentes foram solubilizados com solução de isopropanol ácido composta de ácido clorídrico 0,04 N (HCl, Merck) em isopropanol (Merck), na proporção de 1 mL por poço. As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de poliestireno de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc., EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5) e expressos como absorbância.

1.2.3.2.2 Atividade de ALP em SHAM-MSC e ORX-MSC

A atividade de ALP foi determinada ao final de 7 e 10 dias de cultura, através de um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). A ALP do lisado das amostras hidrolisa o substrato timolftaleína monofosfato do kit e ocorre a liberação de

timolftaleína, que possui cor azul em meio alcalino e esta coloração é diretamente proporcional à atividade enzimática. Para este ensaio, o meio de cultura foi removido dos poços e estes foram lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecido previamente a 37°C. Para promover a lise celular, foi adicionado 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich) em cada poço, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Durante esse período, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina 0,3 M, pH 10,1 em tubos de vidro, e deixados por no mínimo 2 minutos a 37°C. Após o tempo de lise celular, uma alíquota de 50 µL da amostra lisada foi adicionada nos tubos contendo esta solução, os quais foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de uma solução de carbonato de sódio 0,09 M (Na₂CO₃, Merck) e hidróxido de sódio 0,25 M (NaOH, Merck) para o desenvolvimento da coloração e uma alíquota de 150 µL de cada tubo foi transferida para uma placa de poliestireno de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5), corrigidos pelo padrão disponibilizado pelo fabricante e normalizados pelo conteúdo de proteína total, determinado nos mesmos lisados pelo método de Lowry et al. (1951) e expressos como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

1.2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por SHAM-MSC e ORX- MSC

A formação de matriz extracelular mineralizada foi detectada por coloração dos sais de cálcio com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) aos 17 dias de cultura. O meio de cultura foi removido dos poços e adicionados 2 mL de formalina 10% em cada poço por no mínimo 24 horas, para fixação celular. Após esse período, a solução de fixação foi removida e as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois (30, 50, 70 e 100%). Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos, lavadas com água bidestilada corrente e deixadas à temperatura ambiente até secagem completa. As culturas foram então fotografadas com máquina digital Nikon D3200 (Nikon, Japão) e as imagens foram processadas utilizando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated Inc., EUA). A quantificação da formação de matriz extracelular mineralizada foi realizada pela extração do cálcio, de acordo com

método descrito previamente (Gregory et al., 2004). Para tanto, 280 µL de ácido acético 10% foram adicionados em cada poço à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de uma ponteira plástica e a solução foi transferida para tubos de 1,5 mL, os quais foram agitados em vortex durante 30 segundos. Após isso, os tubos foram aquecidos a 85°C durante 10 minutos e transferidos para recipiente contendo gelo picado, onde permaneceram por mais 5 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 13000 g por 20 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada tubo transferidos para uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). Para neutralizar o ácido, foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônia 10% em cada poço. A absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5) e expressos como absorbância.

1.2.4 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de ORX-MSC e de ORX- MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC

1.2.4.1 Obtenção e cultura de SD-MSC e ORX-MSC

SD-MSC e ORX-MSC foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos saudáveis jovens e ORX, respectivamente, sendo os saudáveis jovens com aproximadamente 4 semanas de vida e 150-200 g. As células foram obtidas e cultivadas como descrito no item 1.2.3.1. Em seguida, foram caracterizadas como MSC por citometria de fluxo e utilizadas nos experimentos de cocultura. SD-MSC foram também utilizadas nos experimentos para avaliar o reparo de defeitos de calvária de ratos com osteoporose.

1.2.4.1.1 Caracterização de SD-MSC e ORX-MSC por citometria de fluxo

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e obtida suspensão de células, como descrito no item 1.2.3.2. Para caracterização por citometria de fluxo, SD-MSC e ORX-MSC foram transferidas para tubos na concentração de 5×10^5 células por tubo e incubadas, separadamente, por 30 minutos em ausência de luz, com os anticorpos primários específicos para marcadores de superfície característicos de MSC anti-CD29, anti-CD44, anti-CD90, e anti-CD106; para marcador endotelial anti-CD31; e para marcadores

hematopoiéticos anti-CD34 e anti-CD45 (B&D Biosystems, EUA), os quais foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE-A). Em seguida, as células foram lavadas e homogeneizadas em 2 mL de PBS (Gibco-Life Technologies) e os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados às células 500 μ L de solução de formaldeído (Merck) diluído a 1% em PBS (Gibco-Life Technologies). Os tubos foram estocados a 4°C ao abrigo da luz, até o momento de leitura no fluxo FACSCanto™ (B&D Biosystems), onde as leituras foram feitas a cada 10 mil eventos.

1.2.4.2 Cocultura indireta de SD-MSC e ORX-MSC e diferenciação osteoblástica

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e obtida suspensão de células, como descrito no item 1.2.3.2. As células foram cultivadas em modelo de cocultura indireta utilizando insertos com filtros porosos de 0,4 μ m (Transwell, Corning Incorporated). Inicialmente, SD-MSC e ORX-MSC foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços ou insertos contendo meio de expansão com densidades de plaqueamento de 10^4 células, de forma que os tipos celulares foram cultivados tanto nos insertos como separadamente no fundo dos poços. Para permitir sua aderência, as células foram mantidas separadas durante 2 dias. Após esse período, foi realizada a cocultura indireta substituindo o meio de expansão por meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica. Os controles foram SD-MSC e ORX-MSC cocultivadas em meio osteogênico tanto no inserto quanto no poço, de forma que as coculturas formadas foram SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC (Figura 2). Para avaliação das respostas celulares os insertos foram descartados e as células dos poços foram submetidas às seguintes avaliações: proliferação celular, expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real, expressão proteica de marcadores osteoblásticos por western blot, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada.

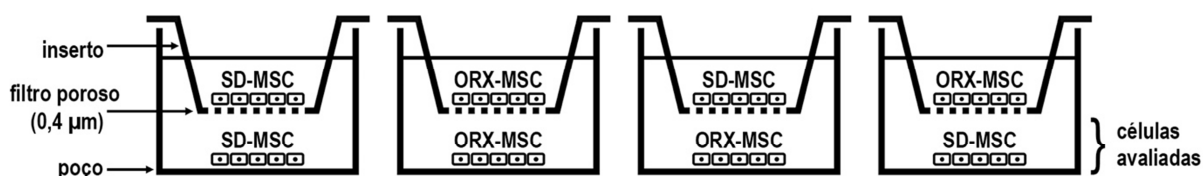


Figura 2. Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e ORX-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico. As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos.

1.2.4.3 Proliferação de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

A proliferação de SD-MSC e ORX-MSC foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cocultura indireta pelo ensaio colorimétrico MTT seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no item 1.2.3.2.1.

1.2.4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

Ao final de 7 e 10 dias de cocultura indireta, foi avaliada a expressão gênica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2*), osterix (*Osx*), *Alp*, sialoproteína óssea (*Bsp*), osteocalcina (*Oc*), osteopontina (*Opn*) e β -catenina (*Ctnnb1*) em SD-MSC e ORX-MSC por PCR (do Inglês polymerase chain reaction) em tempo real. O RNA total foi extraído das amostras por meio do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante e sua integridade foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chips (Agilent Technologies, EUA), também de acordo com as especificações do fabricante. Para quantificação do RNA total, 1 μ L de cada amostra foi lido no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e 1 μ g da amostra foi utilizada para confecção da fita de DNA complementar (cDNA) no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems para PCR em tempo real (Gibco-Life Technologies). As reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc*, *Opn* e *Ctnnb1* foram feitas utilizando o sistema SYBR Green e o aparelho QuantStudio™ 7 Flex System (Applied Biosystems, EUA). Para isso, 7 μ l do reagente SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) que contém o fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, foram misturados com 2,5 μ l da solução de cDNA, 2,5 μ l de água DNase/RNase free e 0,5 μ l da solução contendo cada primer (senso e antisenso) com as concentrações adequadas. Esta solução foi transferida para placas de poliestireno de 96 poços para leitura no aparelho QuantStudio™ 7 (Applied Biosystems). O desenho dos primers foi realizado no Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), considerando uma eficiência entre 95 e 100% (Tabela 1). A reação de amplificação ocorreu por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, que foi empregado para a obtenção de uma

curva de dissociação dos produtos da reação, usada para análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (do Inglês cycle threshold), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão dos genes para *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc*, *Opn* e *Ctnnb1*. Como controle endógeno foi avaliada a expressão dos genes constitutivos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), fator de iniciação de tradução eucariótica 2B, subunidade 1 alfa (*Eif2β1*) e *β-Actina*, sendo o mais estável escolhido para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e os dados, obtidos em quadruplicata (n=4), foram expressos como expressão gênica relativa.

Tabela 1. Sequência de primers para PCR em tempo real

Gene	Sequências Senso e Anti-Senso
<i>Runx2</i>	CGTATTTTCAGATGATGACACTGCC AAATGCCTGGGAAGTGCCTG
<i>Osx</i>	GAGGCCTTTTCGTCTGCAACT CAAGTGGTCGCTTCGGGTAA
<i>Alp</i>	TACTGCTGATCACTCCCACG ACCGTCCACCACCTTGTAAC
<i>Bsp</i>	AGACTGCTTTAATCTTGCTCTGC GTAGCGTGGCCGGTACTTA
<i>Oc</i>	GCATTCTGCCTCTCTGACCTG CCGGAGTCTATTACCTTAC
<i>Opn</i>	GAAGCCTGACCCATCTCAGAA GTTGCTTGAAGAGTTTCTTGCTT
<i>Ctnnb1</i>	ATGGCTTGAATGAGACTGCT GCCGTATCCACCAGAGTGAAA
<i>Gapdh</i>	GACAACTTTGGCATCGTGGA AGGGATGATGTTCTGGGCTG
<i>Eif2β1</i>	TGCTGTTGGCTATATCATGGAGA TGCAACCACATAGAAGGGCT
<i>β-Actina</i>	AACCCTAAGGCCAACCGTG CATACAGGGACAACACAGCCT

1.2.4.5 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e ORX- MSC em cocultura indireta

Ao final de 10 dias de cocultura indireta, a detecção da expressão proteica de ALP e OPN em SD-MSC e ORX-MSC foi realizada por western blot. Para este ensaio, o meio de cultura foi removido dos poços, os quais foram lavados 2 vezes

com PBS (Gibco-Life Technologies) e realizada a lise celular para obtenção da proteína total através da adição de tampão de lise composto por 50 mM Tris base (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1,5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 10% glicerol (Sigma-Aldrich), suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Cell Signalling Technology, EUA). As concentrações de proteína foram quantificadas usando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA) com albumina sérica bovina diluída sequencialmente (Biolabs, EUA). Em seguida, 25 µg de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida com gradiente de 4-10% (Bio-Rad, EUA), separadas através de eletroforese e transferidas a uma membrana de PVDF (do Inglês polyvinylidene fluoride) (Bio-Rad) com o aparelho Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram bloqueadas durante 1 hora com tampão de bloqueio composto por solução salina tamponada com Tris (Sigma-Aldrich) contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T, Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich) ou 2,5% de leite em pó desnatado (Bio-Rad), e incubadas durante 16 horas a 4°C com os anticorpos primários: anti-ALP (Abcam, EUA, ab108337), anti-OPN (Developmental Studies Hybridoma Bank, EUA, MPIIB10) e anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, EUA, sc-25778), nas concentrações indicadas pelos fabricantes. Em seguida, após a lavagem das membranas com TBS-T, elas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase apropriada (anti-coelho IgG, 1:2000; Cell Signalling Technology) diluído em TBS-T e 2,5% de leite em pó desnatado (Santa Cruz Biotechnology). Por fim, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, EUA) por 1 minuto e transferidas para o aparelho G:BOX (SynGene, EUA). As imagens das bandas relativas à expressão das proteínas de interesse e os dados quantitativos foram obtidos pelo software GeneSnap (SynGene). A expressão da proteína constitutiva GAPDH foi utilizada para normalizar a expressão das proteínas ALP e OPN e os dados, obtidos em quadruplicata (n=4), foram expressos como expressão proteica relativa.

1.2.4.6 Atividade de ALP em SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

A atividade de ALP em SD-MSC e ORX-MSC foi avaliada ao final de 7 e 10 dias de cocultura indireta, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no item 1.2.3.2.2.

1.2.4.7 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

A formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e ORX-MSC foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) e quantificada aos 17 dias de cocultura indireta, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no item 1.2.3.2.3.

1.2.4.8 Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

Ao final de 10 dias de cocultura indireta, a análise do perfil de expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de BMP, WNT e ITG durante o processo de diferenciação osteoblástica foi realizado através da técnica PCR array utilizando o sistema TaqMan Array Plates (Thermo Fischer Scientific). Esta técnica permite a análise simultânea de até 64 genes alvo envolvidos em cada via de sinalização celular. A extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total foram realizados como descrito no item 1.2.4.4. A partir de 4 µg de RNA total confeccionou-se a fita de cDNA no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf) utilizando-se do kit SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fischer Scientific) para PCR Array, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foram misturados 40 µL de reação de síntese de cDNA diluído 10 vezes em água DNase/RNase free e 440 µL do reagente TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Na sequência, foram adicionados 800 µL desta mistura em cada placa de 384 poços contendo as sondas Taqman para os genes de interesse (Tabela 2). A reação de amplificação foi realizada no aparelho QuantStudio™ 7 Flex System (Applied Biosystems) e ocorreu por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 92°C e quarenta ciclos de 1 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C. Os dados obtidos foram analisados através do Software ExpressionSuite (Thermo Fischer Scientific). A confecção dos heatmaps e diagramas de venn foi realizada a partir dos dados analisados no Software ExpressionSuite através dos sites <http://www.heatmapper.ca/expression/> e <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, respectivamente.

Tabela 2. Sondas Taqman para PCR Array

BMP		WNT		ITG	
Assay ID	Gene	Assay ID	Gene	Assay ID	Gene
Rn00577947_m1	<i>Acvr1</i>	Rn00560714_m1	<i>Apc</i>	Rn00667357_m1	<i>Actn1</i>
Rn01753812_m1	<i>Acvr2a</i>	Rn00577929_m1	<i>Axin1</i>	Rn00591594_m1	<i>Actn3</i>
Rn01446367_m1	<i>Acvr2b</i>	Rn00577441_m1	<i>Axin2</i>	Rn00581554_m1	<i>Actn4</i>
Rn00574526_m1	<i>Acvr1l</i>	Rn01534087_m1	<i>Bcl9</i>	Rn00583646_m1	<i>Akt1</i>
Rn00563784_m1	<i>Atf3</i>	Rn01413743_m1	<i>Btrc</i>	Rn00690901_m1	<i>Akt2</i>
Rn00824644_g1	<i>Atf4</i>	Rn01258147_m1	<i>Camk2a</i>	Rn00442194_m1	<i>Akt3</i>
Rn00594597_m1	<i>Bambi</i>	Rn00560913_m1	<i>Camk2d</i>	Rn00564003_m1	<i>Bcar1</i>
Rn01466011_g1	<i>Bmp1</i>	Rn03020897_m1	<i>Ccnd2</i>	Rn00567422_m1	<i>Capn2</i>
Rn00567818_m1	<i>Bmp2</i>	Rn00584431_g1	<i>Ctnnb1</i>	Rn00755834_m1	<i>Cav1</i>
Rn00690955_mH	<i>Bmp3</i>	Rn01498969_m1	<i>Daam1</i>	Rn00590969_m1	<i>Cav2</i>
Rn00432087_m1	<i>Bmp4</i>	Rn00577351_m1	<i>Dab2</i>	Rn00755343_m1	<i>Cav3</i>
Rn01447676_m1	<i>Bmp5</i>	Rn01421606_m1	<i>Dixdc1</i>	Rn00696671_m1	<i>Cdc42</i>
Rn00432095_m1	<i>Bmp6</i>	Rn01501536_g1	<i>Dkk1</i>	Rn01406955_m1	<i>Diaph1</i>
Rn01528889_m1	<i>Bmp7</i>	Rn01748499_m1	<i>Dkk2</i>	Rn01187530_m1	<i>Flna</i>
Rn01450292_g1	<i>Bmpr1a</i>	Rn01516989_g1	<i>Dvl1</i>	Rn01537993_m1	<i>Flnb</i>
Rn01748421_m1	<i>Bmpr1b</i>	Rn01467529_m1	<i>Dvl2</i>	Rn01471333_g1	<i>Grb2</i>
Rn01437214_m1	<i>Bmpr2</i>	Rn00591432_m1	<i>Ep300</i>	Rn00591471_m1	<i>Ilk</i>
Rn01404818_m1	<i>Chrd</i>	Rn00564119_m1	<i>Fosl1</i>	Rn00578564_m1	<i>Itga1</i>
Rn01463848_m1	<i>Col1a1</i>	Rn01755425_s1	<i>Fzd1</i>	Rn01533928_m1	<i>Itga10</i>
Rn00670279_g1	<i>Col1a2</i>	Rn00597004_s1	<i>Fzd2</i>	Rn01421747_m1	<i>Itga11</i>
Rn01512989_g1	<i>Dlx2</i>	Rn00596479_m1	<i>Fzd3</i>	Rn01489315_m1	<i>Itga2</i>
Rn00576012_m1	<i>Dnaja1</i>	Rn00433382_m1	<i>Fzd4</i>	Rn01456695_g1	<i>Itga2b</i>
Rn01438763_m1	<i>Eng</i>	Rn01466963_m1	<i>Notum</i>	Rn01751608_m1	<i>Itga3</i>
Rn02396759_m1	<i>Fos</i>	Rn01767781_m1	<i>Fzd6</i>	Rn01512798_m1	<i>Itga4</i>
Rn01492304_m1	<i>Gdf3</i>	Rn01441541_m1	<i>Fzd7</i>	Rn01761831_m1	<i>Itga5</i>
Rn00433564_m1	<i>Gdf5</i>	Rn01526420_s1	<i>Fzd8</i>	Rn01512708_m1	<i>Itga6</i>
Rn01442797_m1	<i>Gdf6</i>	Rn01444108_m1	<i>Gsk3b</i>	Rn01529365_m1	<i>Itga7</i>
Rn01769158_m1	<i>Gdf7</i>	Rn99999045_s1	<i>Jun</i>	Rn01487205_m1	<i>Itga8</i>
Rn01517849_g1	<i>Gsc</i>	Rn01639120_m1	<i>Lef1</i>	Rn01754645_m1	<i>Itgal</i>
Rn00562985_s1	<i>Id1</i>	Rn01451428_m1	<i>Lrp5</i>	Rn00709342_m1	<i>Itgam</i>
Rn01495280_m1	<i>Id2</i>	Rn01492711_m1	<i>Lrp6</i>	Rn01485633_m1	<i>Itgav</i>
Rn04219390_g1	<i>Id3</i>	Rn01425765_m1	<i>Mitf</i>	Rn01511082_m1	<i>Itgax</i>
Rn00570354_m1	<i>lfrd1</i>	Rn00689241_m1	<i>Mmp7</i>	Rn00566727_m1	<i>Itgb1</i>
Rn00710306_m1	<i>Igf1</i>	Rn07310910_m1	<i>Myc</i>	Rn01427948_m1	<i>Itgb2</i>
Rn00561423_m1	<i>Inha</i>	Rn01762487_m1	<i>Nfat5</i>	Rn00596601_m1	<i>Itgb3</i>
Rn01538592_m1	<i>Inhba</i>	Rn01538192_m1	<i>Nkd1</i>	Rn00566017_m1	<i>Itgb4</i>
Rn01467303_g1	<i>Map2k3</i>	Rn01409297_m1	<i>Nkd2</i>	Rn00595859_m1	<i>Itgb5</i>
Rn00586764_m1	<i>Map2k6</i>	Rn01496217_g1	<i>Nlk</i>	Rn01747277_m1	<i>Itgb6</i>
Rn01437015_m1	<i>Map3k7</i>	Rn01316994_m1	<i>Pitx2</i>	Rn00671828_m1	<i>Mapk1</i>
Rn01407663_g1	<i>Mapk11</i>	Rn00565707_m1	<i>Ppard</i>	Rn00820922_g1	<i>Mapk3</i>

Rn00578842_m1	<i>Mapk14</i>	Rn01455360_m1	<i>Pygo2</i>	Rn00664986_m1	<i>Pak1</i>
Rn01433624_m1	<i>Nodal</i>	Rn00589172_m1	<i>Rhoa</i>	Rn00584005_m1	<i>Pak2</i>
Rn01467399_s1	<i>Nog</i>	Rn01763806_m1	<i>Ror1</i>	Rn00693022_m1	<i>Pak3</i>
Rn00569082_m1	<i>Runx1</i>	Rn01757507_m1	<i>Ror2</i>	Rn01764387_m1	<i>Pak4</i>
Rn01481341_m1	<i>Serpine1</i>	Rn01478472_m1	<i>Sfrp1</i>	Rn00571958_m1	<i>Parva</i>
Rn00565555_m1	<i>Smad1</i>	Rn01458837_m1	<i>Sfrp2</i>	Rn01408490_m1	<i>Pip5k1c</i>
Rn00565331_m1	<i>Smad3</i>	Rn00585549_m1	<i>Sfrp4</i>	Rn01496145_m1	<i>Prkca</i>
Rn00570593_m1	<i>Smad4</i>	Rn01766277_m1	<i>Sfrp5</i>	Rn00562312_m1	<i>Prkcb</i>
Rn00572484_m1	<i>Smad5</i>	Rn01452748_m1	<i>Tcf3</i>	Rn00440861_m1	<i>Prkcg</i>
Rn01766978_m1	<i>Smad6</i>	Rn00493446_m1	<i>Tcf7</i>	Rn00477208_m1	<i>Pten</i>
Rn01523958_m1	<i>Smad7</i>	Rn01411019_m1	<i>Tcf7l2</i>	Rn01746751_m1	<i>Itga9</i>
Rn00685011_m1	<i>Smad9</i>	Rn00586968_m1	<i>Wif1</i>	Rn01505115_m1	<i>Ptk2</i>
Rn01450612_s1	<i>Sox4</i>	Rn01505161_m1	<i>Wisp1</i>	Rn01533681_g1	<i>Rap1a</i>
Rn00676955_g1	<i>Stat1</i>	Rn01761722_m1	<i>Wnt1</i>	Rn01509461_gH	<i>Rap1b</i>
Rn00572010_m1	<i>Tgfb1</i>	Rn01532988_m1	<i>Wnt10b</i>	Rn01438705_m1	<i>Rapgef1</i>
Rn00579674_m1	<i>Tgfb2</i>	Rn01510238_m1	<i>Wnt11</i>	Rn01447219_m1	<i>Rasgrf1</i>
Rn00565937_m1	<i>Tgfb3</i>	Rn00627297_m1	<i>Wnt2b</i>	Rn01532934_m1	<i>Itgb7</i>
Rn01442102_m1	<i>Tgfb1</i>	Rn01470643_m1	<i>Wnt3a</i>	Rn01458715_g1	<i>Shc1</i>
Rn00688966_m1	<i>Tgfb1</i>	Rn01402000_m1	<i>Wnt5a</i>	Rn01171467_m1	<i>Shc2</i>
Rn00579682_m1	<i>Tgfb2</i>	Rn01492357_m1	<i>Wnt5b</i>	Rn00577971_m1	<i>Sost</i>
Rn00568482_m1	<i>Tgfb3</i>	Rn01425352_m1	<i>Wnt7a</i>	Rn00583063_m1	<i>Src</i>
Rn01418715_m1	<i>Tfif1</i>	Rn01496604_m1	<i>Wnt9a</i>		
Rn00686175_m1	<i>Tnfrsf10</i>	Rn00457102_m1	<i>Wnt9b</i>		

1.2.5 Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

1.2.5.1 Obtenção e cultura de SD-MSC

SD-MSC foram obtidas e cultivadas como descrito no item 1.2.4.1.

1.2.5.1.1 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC

Ao final de 7 dias de cultura em meio de expansão, foi obtida suspensão de células, como descrito no item 1.2.3.2. Em seguida, SD-MSC foram transferidas para tubos na concentração de 5×10^5 células por tubo e incubadas, separadamente, com os anticorpos primários anti-MHC classes I e II (Abcam), respectivamente; os quais foram conjugados com FITC, para realização da citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no item 1.2.4.1.1.

1.2.5.2 Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos

Os ratos com osteoporose foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos nas calvárias (Figura 3). Para isso, os animais foram anestesiados, como descrito no item 1.2.2.1, e após tricotomia e antissepsia com solução de povidina-iodo alcoólica (Riodeine, Rioquímica) na região dorsal da cabeça, foi realizada uma incisão na pele e tecido subcutâneo, no sentido anteroposterior, ao longo da sutura sagital mediana com finalidade de expor os ossos parietais. O perióstio do osso parietal esquerdo foi descolado e o defeito foi produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro sob irrigação abundante com soro fisiológico, acoplada em motor cirúrgico (Gnatus, Brasil). A opção pelo defeito unilateral e não bilateral teve como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral (GOMES; FERNANDES, 2011). A hemostasia foi realizada com gaze estéril e a sutura dos tecidos com fio mononylon 3-0 (Ethicon). Os limites dos defeitos ósseos foram demarcados na pele dos animais com marcadores permanentes para permitir sua localização no momento da injeção de células. Em seguida, os animais foram medicados como descrito no item 1.2.2. e transferidos ao biotério, onde foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas com troca da maravalha três vezes por semana.

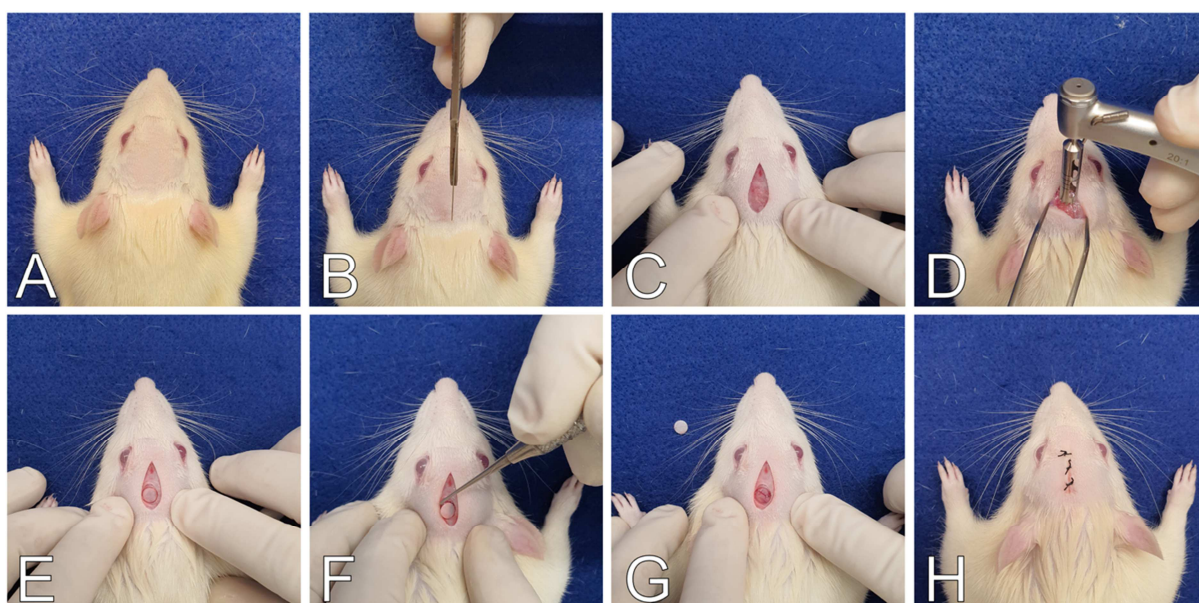


Figura 3. Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos nas calvárias. A) Tricotomia e antissepsia. B) Incisão anteroposterior. C) Exposição do tecido ósseo. D) Utilização de trefina. E) Defeito ósseo demarcado. F) Remoção do tecido ósseo. G) Defeito ósseo. H) Sutura.

1.2.5.3 Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos

Após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos, os animais foram submetidos a nova intervenção para a injeção de SD-MSC ou veículo (PBS-Controle) (Figura 4). No dia da injeção, foi obtida a suspensão de SD-MSC como descrito nos itens 1.2.3.2 e 1.2.4.2 e os animais foram anestesiados como descrito no item 1.2.2. Os limites dos defeitos ósseos foram determinados por palpação a fim de possibilitar sua localização para a injeção. Em seguida, uma agulha hipodérmica de 0,80 x 25 mm e 21-G (BD PrecisionGlide, Becton Dickinson, EUA) acoplada a uma micropipeta foi inserida tangenciando a calota craniana de tal forma que a extremidade da agulha estivesse próxima ao centro do defeito e com o bisel voltado para o seu interior na posição ventral. Posteriormente, as células foram injetadas, na quantidade de 5×10^6 células em PBS, para um volume final de 50 μ L em cada defeito.

Esse procedimento foi realizado para avaliar o tempo de permanência das células e a formação de tecido ósseo nos defeitos de calvária.

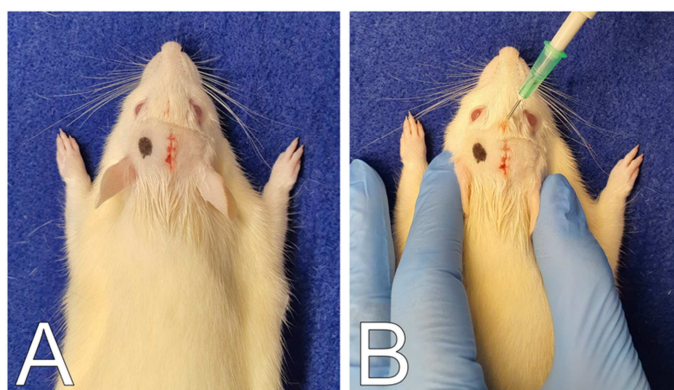


Figura 4. Injeção local de células ou PBS nos defeitos ósseos nas calvárias. A) Aspecto após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos. B) Determinação dos defeitos ósseos por palpação e realização de injeção local.

1.2.5.4 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose

Com o objetivo de avaliar o tempo de permanência das células injetadas nos defeitos ósseos, SD-MSC foram transduzidas com virions contendo o vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-puro, gentilmente cedido pelo Dr. Deivid de Carvalho Rodrigues, que codifica o repórter bioluminescente luciferase e o marcador de resistência puromicina N-acetil-transferase sob o controle de um promotor de vírus de MSC murino. Para a transdução, SD-MSC foram incubadas com 3 virions por célula (MOI

= 3, do Inglês multiplicity of infection) e 8 µg/mL de polibreno. Após 48 horas, a seleção foi realizada com puromicina 1 µg/mL durante 6 dias, após os quais a atividade biológica de luciferase foi avaliada por imagem bioluminescente in vitro e as colônias resistentes foram cultivadas para obter SD-MSC^{luc}, que foram injetadas nos animais como descrito acima.

Após a injeção de SD-MSC^{luc}, 5 minutos antes da análise, os animais receberam injeção subcutânea do substrato D-luciferina (Perkin Elmer, EUA) realizada próxima a região dos defeitos ósseos, na dosagem de 150 mg/kg. Em seguida os sinais de luminescência gerados pela reação de D-luciferina reagindo com a luciferase expressa pelas células foram captados no equipamento IVIS Spectrum (Perkin Elmer). Os sinais de luminescência foram observados e quantificados no software Living Image® (Xenogen, EUA) até quando houve o desaparecimento total do sinal. Os dados foram obtidos em sextuplicata (n=6) e expressos como bioluminescência (fótons/segundo). Como controle, foram utilizados animais que receberam injeção de PBS.

1.2.5.5 Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com osteoporose

Com o objetivo de determinar a formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com osteoporose, os animais foram divididos em 2 grupos: SD-MSC tratados com injeção de células e Controle, com injeção de PBS.

Decorridas 4 semanas da injeção, foi realizada a eutanásia dos animais como descrito no item 1.2.2.1. Esse período foi selecionado baseado em observações anteriores utilizando o mesmo tipo de defeito ósseo (BELOTI et al., 2012; SICCHIERI et al., 2012; DE SANTANA SANTOS et al., 2015). Após a eutanásia, as calvárias foram removidas com a utilização de disco diamantado (KG Sorensen, Medical Burs, Brasil) acoplado em motor elétrico (Beltec, Brasil) e fixadas em solução de formol tamponado 10% (pH=7) (Merck) por 48 horas para avaliação do tecido ósseo formado por microtomografia computadorizada (µCT), seguida de processamento para análise histológica ou para avaliação de marcadores osteoblásticos no tecido formado nos defeitos por PCR em tempo real.

1.2.5.6 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

Para avaliar o tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose após injeção de SD-MSD ou PBS, as calvárias (n=12 por grupo) foram escaneadas em microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker) e as projeções tomográficas 2D e reconstruções tomográficas 3D, foram submetidas à análise morfométrica como descrito no item 1.2.2.1. Os seguintes parâmetros foram avaliados: BV, BV/TV, BS, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp.

1.2.5.7 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

Após o escaneamento por μ CT, as amostras foram descalcificadas em EDTA 4% (Sigma-Aldrich), lavadas em água corrente e desidratadas por meio de uma sequência de álcoois com concentração crescente (50 a 100%). Em seguida, foi realizada a diafanização das peças em xilol até ficarem transparentes e a impregnação em parafina foi realizada em estufa a 60°C, com três banhos de 3 horas. Na etapa seguinte, foi realizada a inclusão das peças em formas com parafina e o corte em micrótomo com espessura de 5 μ m seguido de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram obtidas em microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (AxioCam ICc3, Carl Zeiss) para descrição das estruturas celulares e teciduais.

1.2.5.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

Para avaliação da expressão dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* por PCR em tempo real, o tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose após injeção de PBS ou SD-MSD foi removido com o uso de uma trefina de 6 mm de diâmetro, sob irrigação abundante com soro fisiológico. As amostras foram lavadas com PBS (Gibco-Life Technologies), acondicionadas em tubo de 1,5 mL e armazenadas a -80°C. Em seguida, as amostras (n=4, por grupo) foram transferidas para um cadinho de porcelana previamente levado à estufa a 200°C por 6 horas e adicionado nitrogênio líquido. Com auxílio de um pistilo foi realizado o maceramento das amostras através

de força mecânica até que todo tecido ósseo se torna-se fragmentado e com o aspecto de pó. Na sequência, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Gibco-Life Technologies) e as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 e armazenadas a -20°C até serem processadas. A extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total, bem como a reação de PCR em tempo real foram realizados como descrito no item 1.2.4.4.

1.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SigmaPlot 14 (Systat Software Inc, Reino Unido). Os dados obtidos foram agrupados e tabulados para realizar a estatística descritiva (cálculos de média e desvio-padrão) para serem representados na forma de gráficos.

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

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Efeito da osteoporose no tecido ósseo

A análise das reconstruções microtomográficas 3D mostrou, após 90 dias da cirurgia de orquiectomia ou SHAM, diferenças qualitativas na estrutura óssea da porção distal dos fêmures entre os ratos SHAM e ORX. Nos SHAM notou-se maior densidade de trabéculas (Figura 5A,B), quando comparados com os ORX, nos quais houve redução da densidade trabecular (Figura 5C,D).

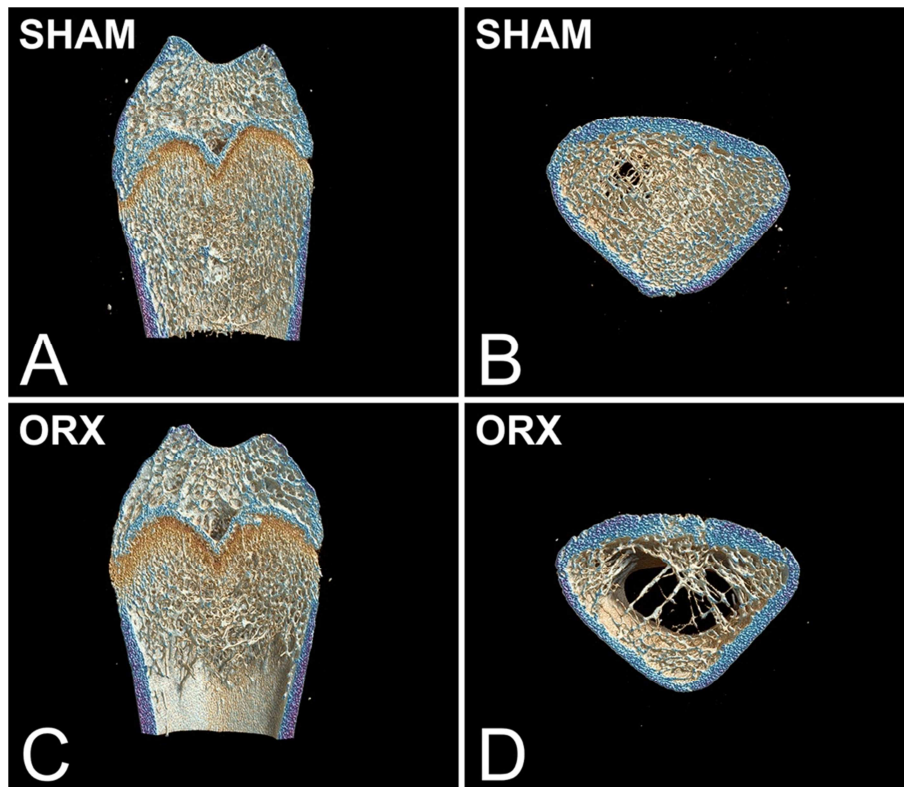


Figura 5. Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos submetidos à cirurgia fictícia (SHAM; A e B) ou à cirurgia de orquiectomia bilateral (ORX; C e D) após 90 dias do procedimento cirúrgico.

As análises morfométricas (Figura 6A-H) mostraram que os parâmetros BV ($p=0,001$), BV/TV ($p=0,002$), BS ($p=0,001$), Tb.Th ($p=0,001$), Tb.N ($p=0,001$), Conn.D ($p=0,001$) e BMD ($p=0,004$) dos ratos ORX foram menores comparados com os SHAM, enquanto a Tb.Sp ($p=0,002$) foi maior.

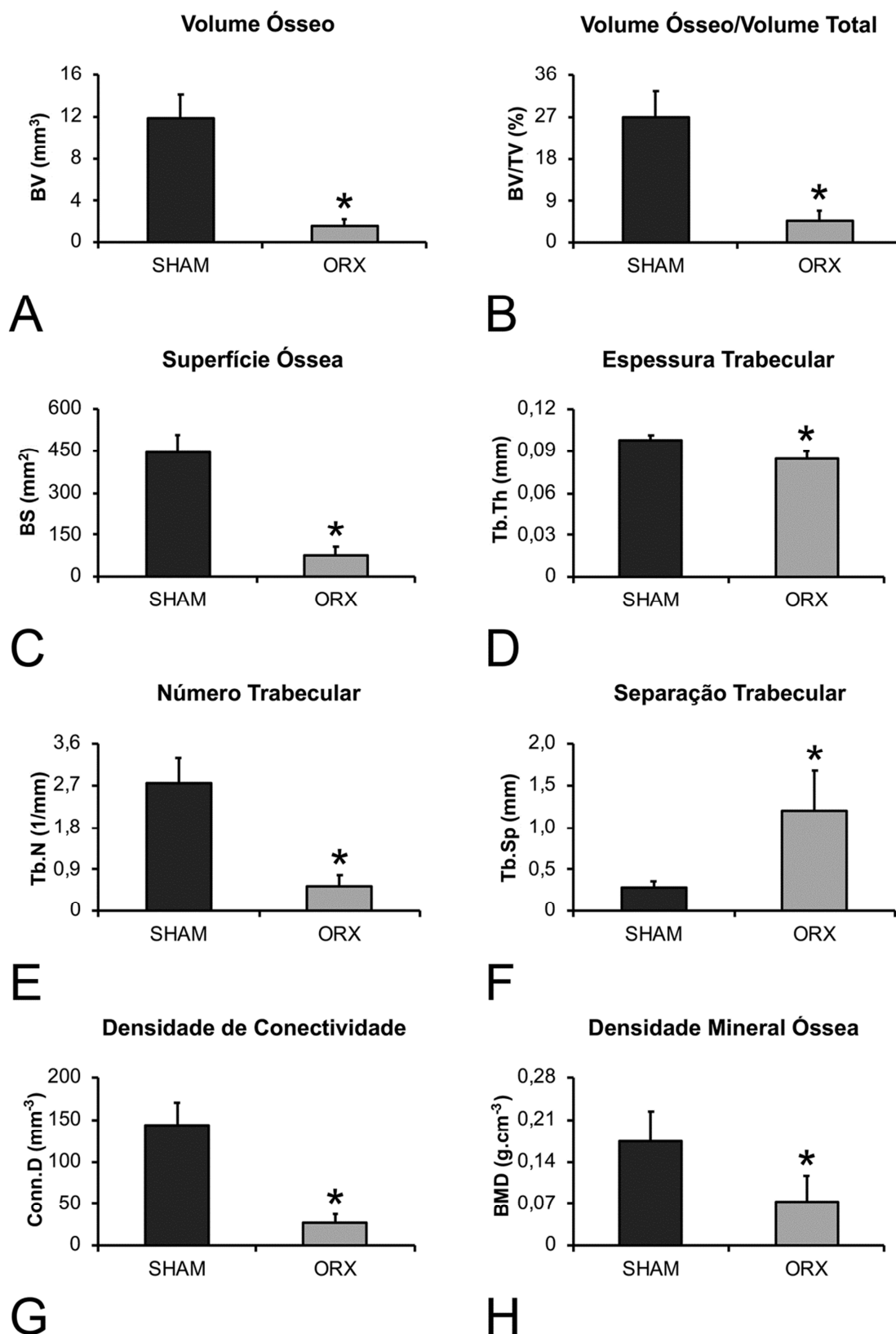


Figura 6. Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) ou à cirurgia de orquiectomia bilateral (ORX), após 90 dias do procedimento cirúrgico. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=6$).

1.3.2 Efeito da osteoporose sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

1.3.2.1 Proliferação de SHAM-MSC e ORX-MSC

Os resultados de proliferação de SHAM-MSC e ORX-MSC (Figura 7A) mostraram que as culturas apresentaram comportamento diferente entre si. Ambas SHAM-MSC e ORX-MSC proliferaram de 3 para 7 dias, mas o número de células diminuiu entre 7 e 10 dias ($p=0,001$, para ambos os intervalos). Em todos os períodos avaliados, SHAM-MSC apresentaram maior número de células que ORX-MSC ($p=0,001$, $p=0,001$, e $p=0,015$, respectivamente).

1.3.2.2 Atividade de ALP em SHAM-MSC e ORX-MSC

Os resultados da atividade de ALP em SHAM-MSC e ORX-MSC (Figura 7B) mostraram que, independentemente dos tipos de culturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 e 10 dias de cultura, houve maior atividade de ALP em SHAM-MSC comparadas às ORX-MSC ($p=0,011$ e $p=0,004$, respectivamente).

1.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por SHAM-MSC e ORX-MSC

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada por SHAM-MSC e ORX-MSC (Figura 7C) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi maior em SHAM-MSC comparadas às ORX-MSC ($p=0,001$).

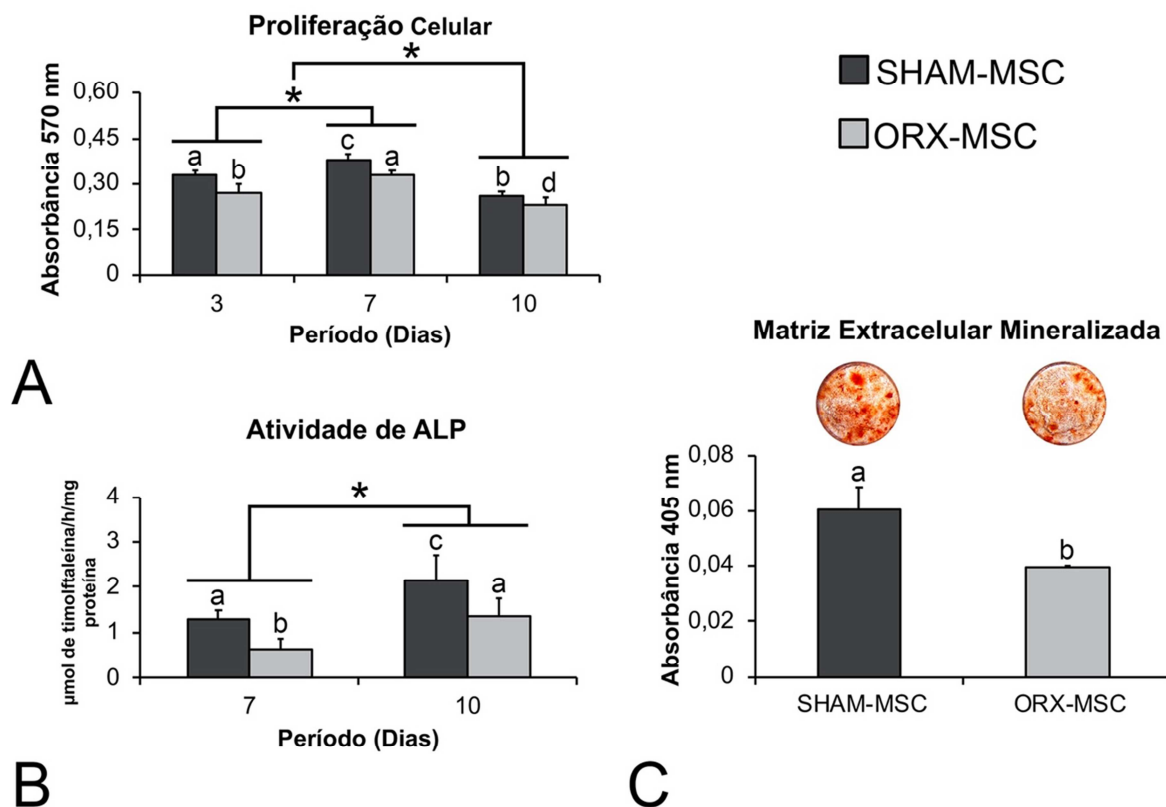


Figura 7. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de SHAM-MSC e ORX-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=5; $p \leq 0,05$).

1.3.3 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de ORX-MSC e de ORX-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC

1.3.3.1 Caracterização de SD-MSC e ORX-MSC por citometria de fluxo

Após 7 dias de cultura em meio de expansão, o perfil de expressão dos marcadores de superfície confirmou que as culturas de SD-MSC e ORX-MSC apresentaram características de MSC. As SD-MSC apresentaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem expressando CD31, CD34, CD44, CD45 e CD106 (Figura 8A-G).

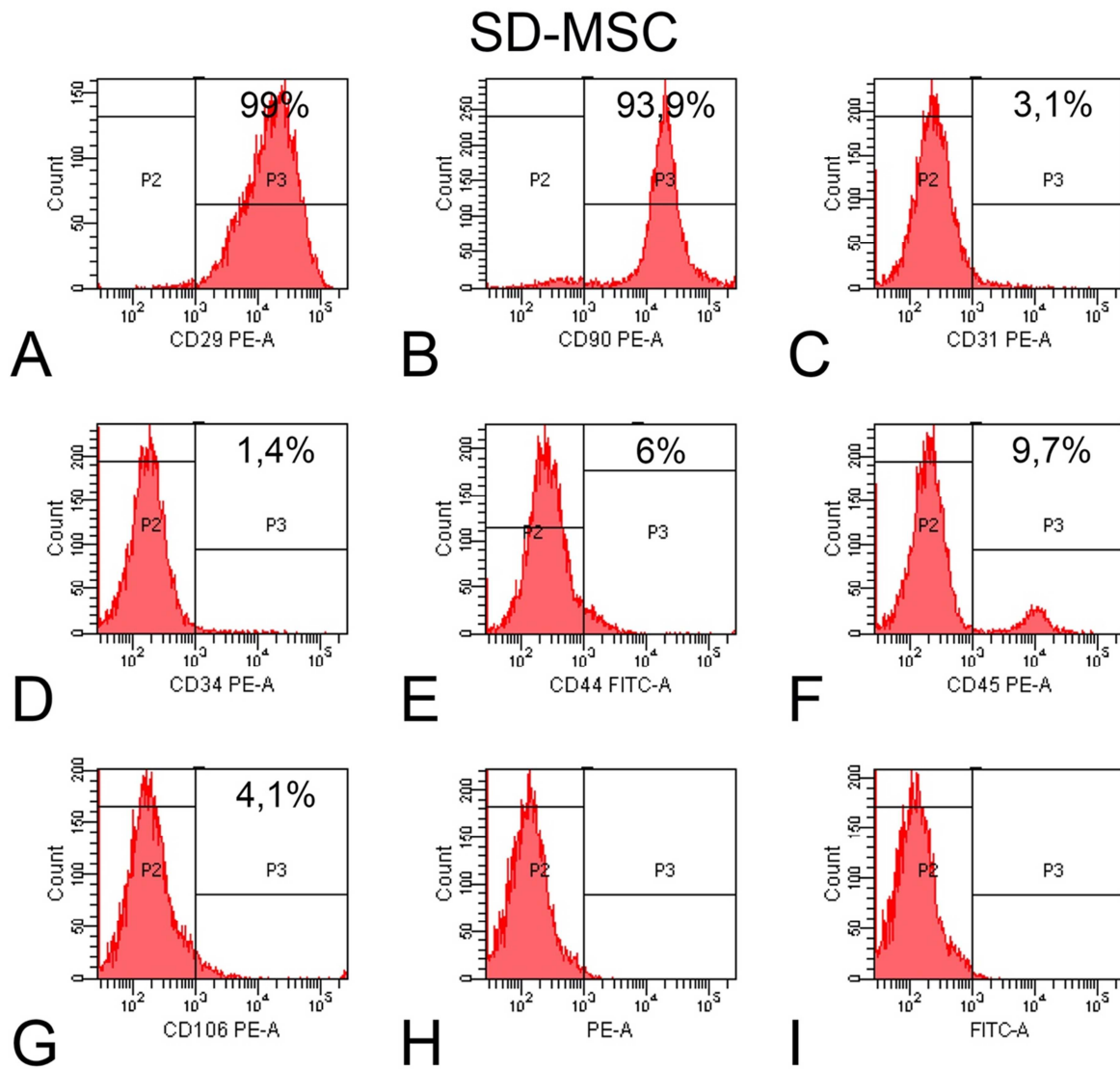


Figura 8. Histogramas e porcentagem de SD-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).

Por sua vez, as ORX-MSC apresentaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90, aproximadamente metade delas expressaram CD45 e baixas porcentagens expressaram CD31, CD34, CD44 e CD106 (Figura 9A-G),

ORX-MSC

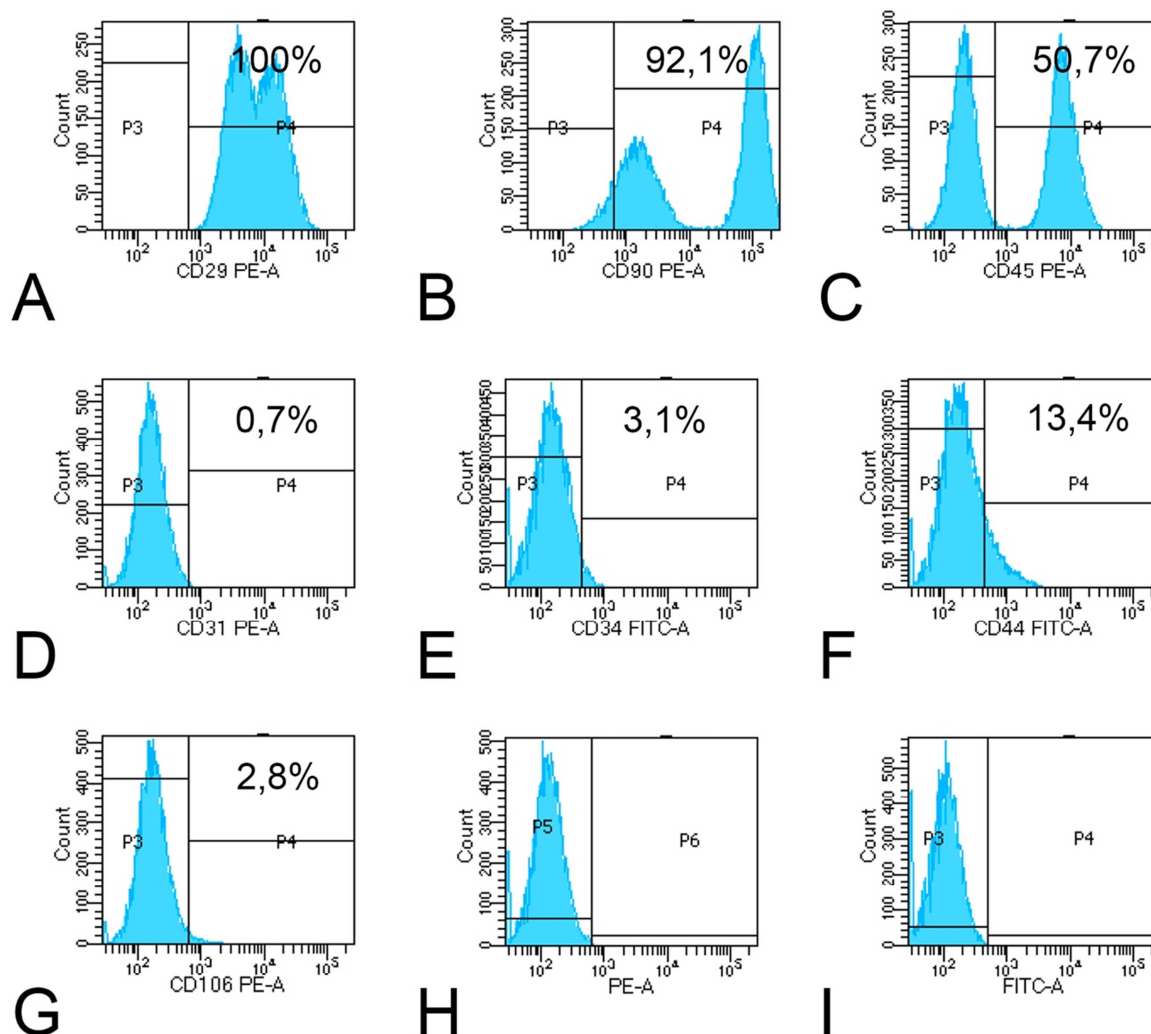


Figura 9. Histogramas e porcentagem de ORX-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD45 (C), CD31 (D), CD34 (E), CD44 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).

1.3.3.2 Proliferação de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

Os resultados da proliferação (Figura 10) mostraram que, independentemente dos tipos de coculturas avaliadas, houve proliferação celular porque foi observado aumento do número de células de 3 para 7 dias e de 7 para 10 dias ($p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente). Aos 3 e 7 dias de cocultura não houve diferença estatisticamente significativa no número de células entre as coculturas. No entanto, aos 10 dias ORX-MSC→SD-MSC tinha mais células do que SD-MSC→SD-MSC e SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,004$ e $p=0,023$, respectivamente), mas não foram diferentes em relação a ORX-MSC→ORX-MSC ($p=0,087$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa.

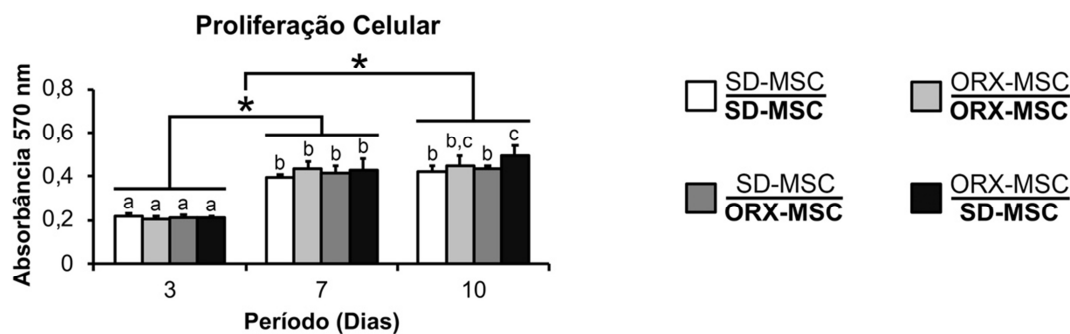


Figura 10. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).

1.3.3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

A expressão relativa do gene *Runx2* (Figura 11A) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,192$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em SD-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC, que foi maior comparada a ORX-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$).

A expressão relativa do gene *Osx* (Figura 11B) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Osx* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,003$), que foi maior comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$). Aos 10 dias a expressão relativa de *Osx* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC, quando comparada a SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,002$ e $p=0,001$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,079$). No mesmo período, a menor expressão relativa de *Osx* foi observada em SD-MSC→SD-MSC comparada a ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC E ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para todos).

A expressão relativa do gene *Alp* (Figura 11C) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Alp* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,002$), que foi maior comparada a SD-MSC→SD-MSC e SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$ e $p=0,044$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,098$). Aos 10 dias a expressão relativa de *Alp* não foi diferente entre ORX-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,537$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,162$).

A expressão relativa do gene *Bsp* (Figura 11D) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$).

A expressão relativa do gene *Oc* (Figura 11E) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Oc* não foi diferente entre ORX-MSC→ORX-MSC e SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,999$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,060$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Oc* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$).

A expressão relativa do gene *Opn* (Figura 11F) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão

relativa de *Opn* não foi diferente entre ORX-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,428$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$, para ambas). No mesmo período, a expressão relativa de *Opn* foi maior em SD-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Opn* foi maior em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,721$).

A expressão relativa do gene *Ctnnb1* (Figura 11G) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em ORX-MSC→SD-MSC quando comparada a ORX-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e ORX-MSC→ORX-MSC ($p=0,865$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→ORX-MSC ($p=0,001$, para ambas) e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,356$).

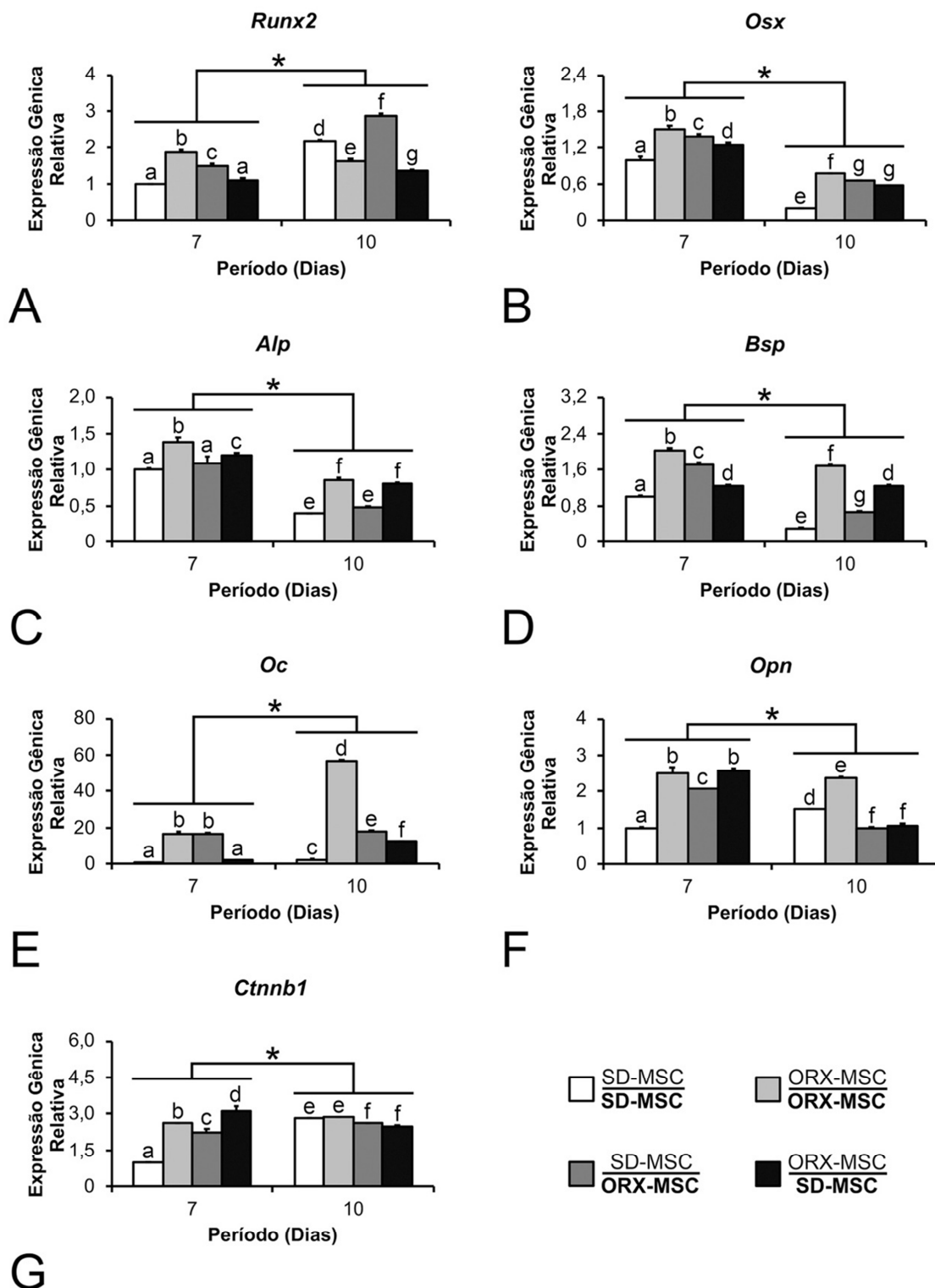


Figura 11. Expressão gênica relativa de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Opn* (F) e *Ctnnb1* (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).

1.3.3.4 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

A expressão relativa da proteína ALP (Figura 12A) foi menor em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,049$, $p=0,004$ e $p=0,010$, respectivamente), que por sua vez, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

A expressão relativa da proteína OPN (Figura 12B) foi maior em SD-MSC→ORX-MSC quando comparada a ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,050$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,004$ e $p=0,001$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,300$).

1.3.3.5 Atividade de ALP em SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

Os resultados da atividade de ALP (Figura 12C) mostraram que, independentemente dos tipos de coculturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias de cocultura, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre as coculturas. No entanto, aos 10 dias, houve maior atividade de ALP em SD-MSC→SD-MSC comparada a SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$ e $p=0,035$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,208$). No mesmo período, a menor atividade ALP foi observada em ORX-MSC→ORX-MSC comparada a SD-MSC→SD-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, $p=0,026$ e $p=0,001$, respectivamente).

1.3.3.6 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e ORX-MSC em cocultura indireta

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada (Figura 12D) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi menor em ORX-MSC→ORX-MSC quando comparada à SD-MSC→SD-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para todas), que por sua vez, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

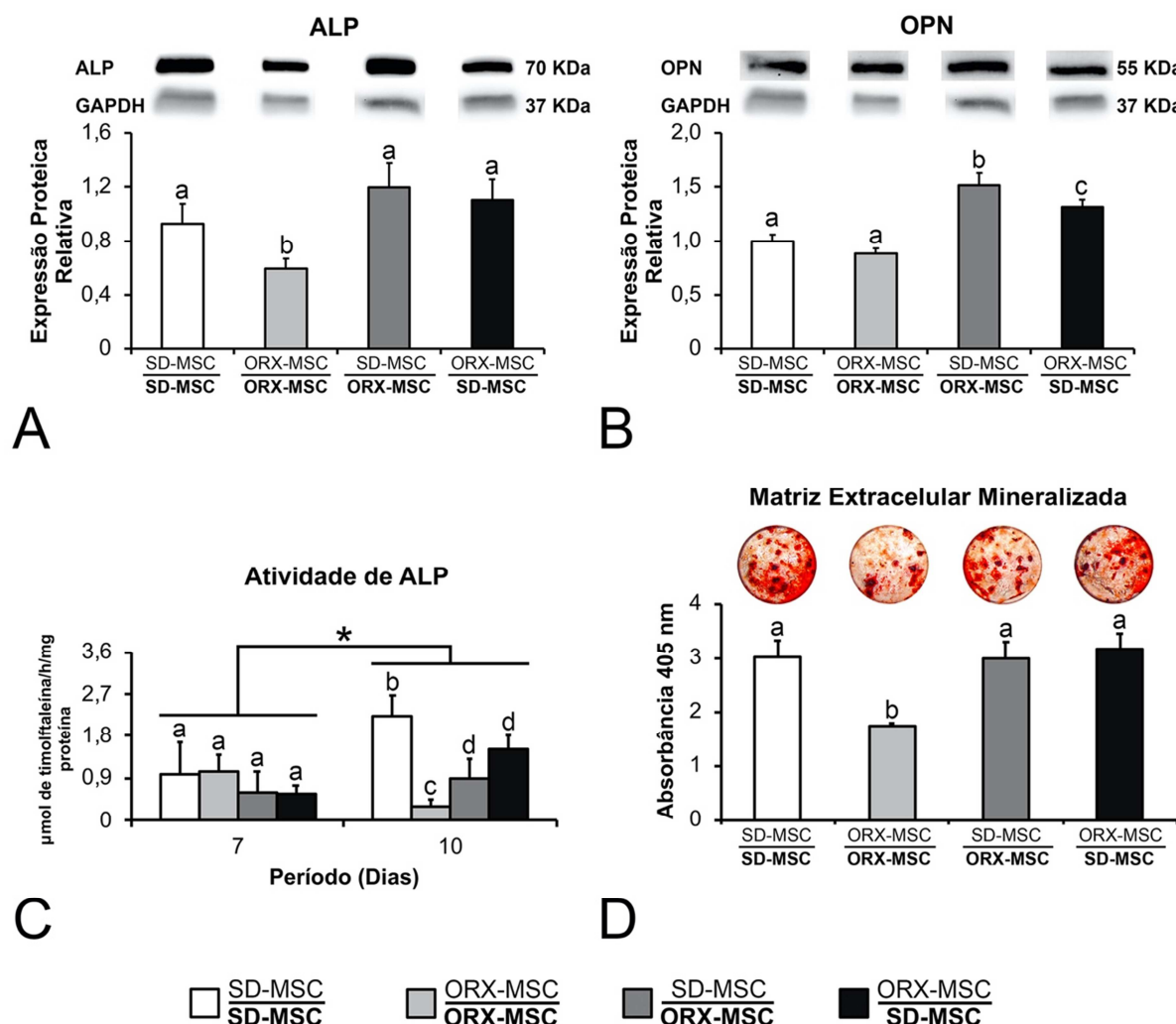


Figura 12. Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significante. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).

1.3.3.7 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e ORX-MSC

Os heatmaps mostram os genes modulados em ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC nas vias de sinalização das BMP (Figura 13A), WNT (Figura 14A) e ITG (Figura 15A).

Na via de BMP, dos 63 genes avaliados, 58 foram diferencialmente expressos em ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 13B). Destes, 4 foram

regulados positivamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 2 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 8 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 13C). Enquanto 11 foram regulados negativamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 3 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 5 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 13D).

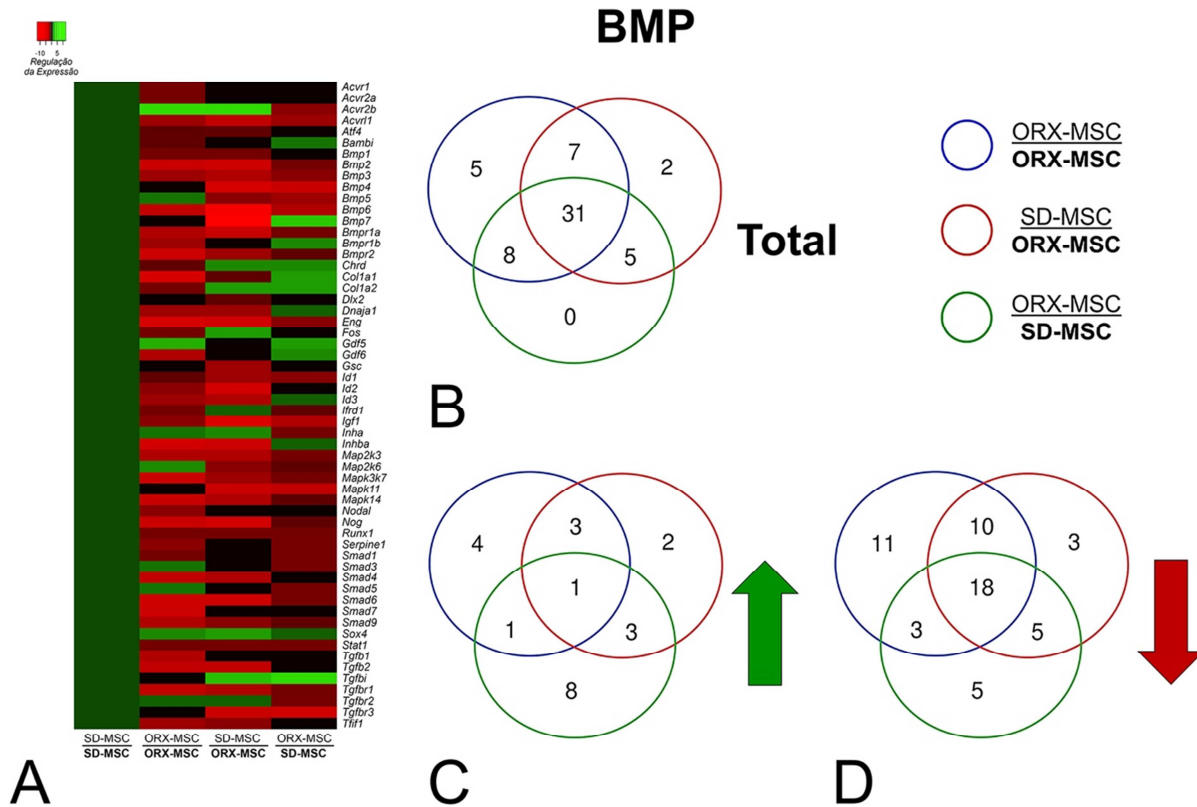


Figura 13. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de WNT, dos 63 genes avaliados, 54 foram diferencialmente expressos em ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 14B). Destes, 1 foi regulado positivamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 1 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 9 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 14C). Enquanto 8 foram regulados negativamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 1 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 2 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 14D).

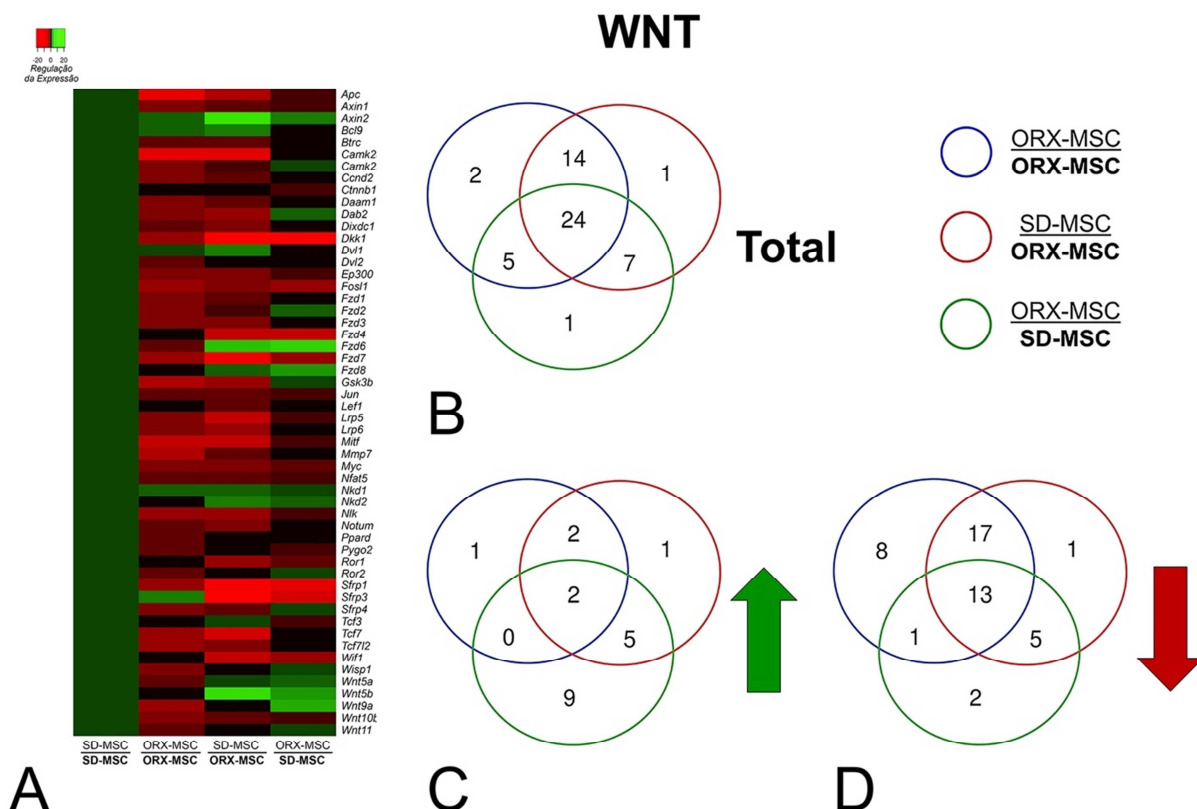


Figura 14. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de ITG, dos 61 genes avaliados, 56 foram diferencialmente expressos em ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 15B). Destes, 1 foi regulado positivamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 2 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 5 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 15C). Enquanto 3 foram regulados negativamente somente em ORX-MSC→ORX-MSC, 3 somente em SD-MSC→ORX-MSC e 4 somente em ORX-MSC→SD-MSC (Figura 15D).

Os genes regulados positiva ou negativamente são mostrados na Tabela 3.

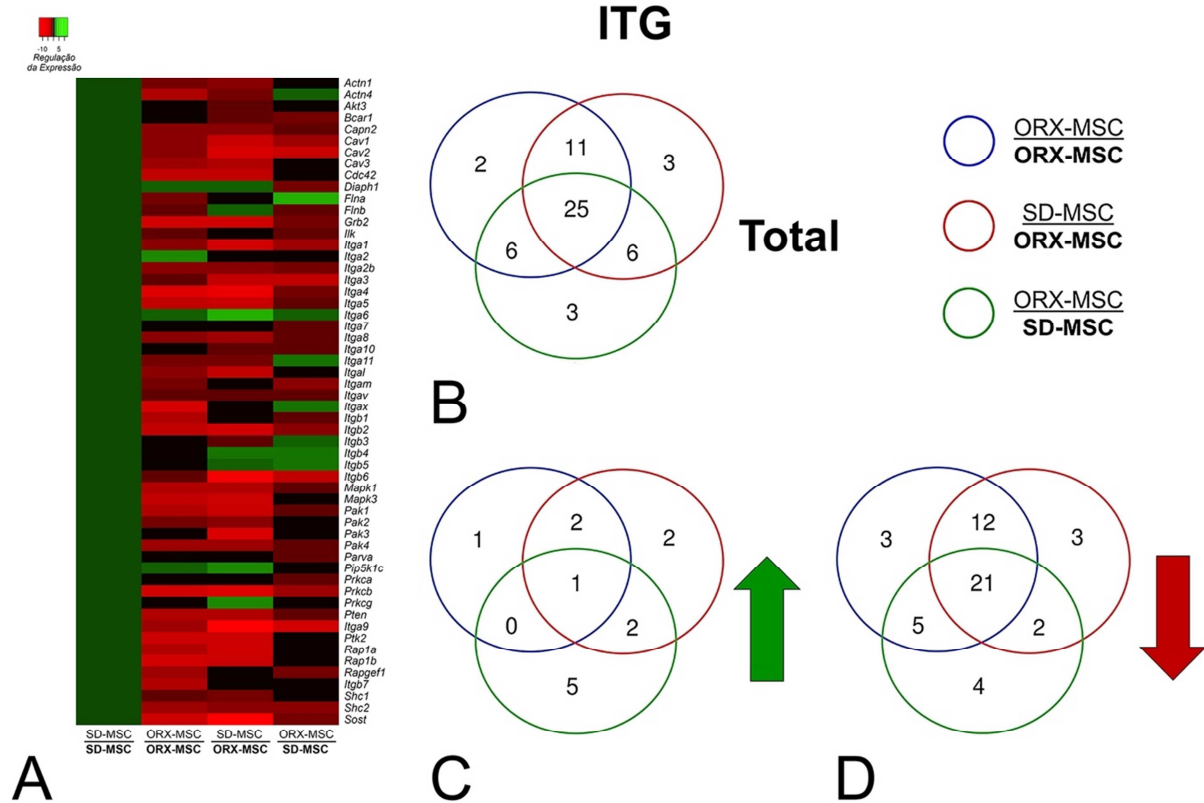


Figura 15. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Tabela 3. Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre ORX-MSC →ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC

Via	Coculturas	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
BMP	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Sox4</i>	<i>Acvr11, Bmp2, Bmp3, Bmp6, Bmpr1a, Bmpr2, Eng, Id1, Igf1, Map2k3, Mapk14, Map3k7, Nog, Runx1, Smad6, Smad9, Stat1, Tgfbr1</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC	<i>Acvr2b, Inha, Tgfbr2</i>	<i>Atf4, Bmp1, Col1a1, Dnaja1, Id2, Id3, Inhba, Smad4, Tff1, Tgfb2</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Gdf5</i>	<i>lfrd1, Serpine1, Smad1</i>
	SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Chrd, Col1a2, Tgfbi</i>	<i>Bmp4, Bmp5, Mapk11, Map2k6, Tgfbr3</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC	<i>Bmp5, Smad3, Smad5, Map2k6</i>	<i>Tgfbr1 Gdf6 Smad7 Chrd Nodal Bambi Fos Col1a2 Acvr1 Acvr2a Bmpr1b</i>
	SD-MSC→ORX-MSC	<i>Fos, lfrd1</i>	<i>Bmp7, Dlx2, Gsc</i>
	ORX-MSC→SD-MSC	<i>Bambi, Bmpr1b, Bmp7, Col1a1, Dnaja1, Gdf6, Id3, Inhba</i>	<i>Acvr2b, Inha, Smad3, Smad5, Tgfbr2</i>
WNT	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Axin2, Nkd1</i>	<i>Apc, Axin1, Dkk1, Ep300, Fosl1, Fzd7, Jun, Lrp5, Myc, Nfat5, Nlk, Sfrp1, Wnt10b</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC	<i>Bcl9, Dvl1</i>	<i>Btrc, Camk2a, Camk2d, Ccnd2, Daam1, Dab2, Dixdc1, Fzd1, Fzd2, Fzd3, Gsk3b, Lrp6, Mmp7, Notum, Sfrp4, Tcf7, Tcf7l2</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	-	<i>Pygo2</i>
	SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Fzd6, Fzd8, Nkd2, Wnt5a, Wnt5b</i>	<i>Fzd4, Mitf, Ror1, Sfrp2, Wif1</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC	<i>Sfrp2</i>	<i>Dvl2, Fzd6, Ror2, Wisp1, Wnt5a, Wnt9a, Wnt11, Ppard</i>
	SD-MSC→ORX-MSC	<i>Tcf3</i>	<i>Lef1</i>
	ORX-MSC→SD-MSC	<i>Camk2d, Dab2, Fzd2, Gsk3b, Ror2, Sfrp4, Wisp1, Wnt9a, Wnt11</i>	<i>Ctnnb1, Tcf3</i>
ITG	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Itga6</i>	<i>Capn2, Cav1, Cav2, Grb2, Itga1, Itga3, Itga4, Itga5, Itga8, Itga9, Itga2b, Itgav, Itgb2, Itgb6, Mapk1, Pak1, Pak4, Prkcb, Pten, Shc2, Sost</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC	<i>Diaph1, Pip5k1c</i>	<i>Actn1, Actn4, Cav3, Cdc42, Itga11, Itgal, Mapk3, Pak2, Ptk2, Rap1a, Rap1b, Shc1</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	-	<i>Flnb, Ilk, Itgam, Itgb1, Rapgef1</i>
	SD-MSC→ORX-MSC ORX-MSC→SD-MSC	<i>Itgb4, Itgb5</i>	<i>Bcar1, Itga10</i>
	ORX-MSC→ORX-MSC SD-MSC→ORX-MSC	<i>Itga2 Flnb, Prkcg</i>	<i>Flna, Itga3, Itgax, Itgb7 Akt3, Itgb3, Pak3</i>
	ORX-MSC→SD-MSC	<i>Actn4, Flna, Itga11, Itgax, Itgb3</i>	<i>Diaph1, Itga7, Parva, Prkca</i>

1.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

1.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC

Após 7 dias de cultura em meio de expansão, as SD-MSC utilizadas para o tratamento dos defeitos ósseos foram analisadas quanto a expressão das moléculas do MHC classes I e II e os resultados mostraram que, ao final desse período, as células apresentaram moderada porcentagem de células expressando MHC classe I e baixa porcentagem expressando MHC classe II (Figura 16A,B).

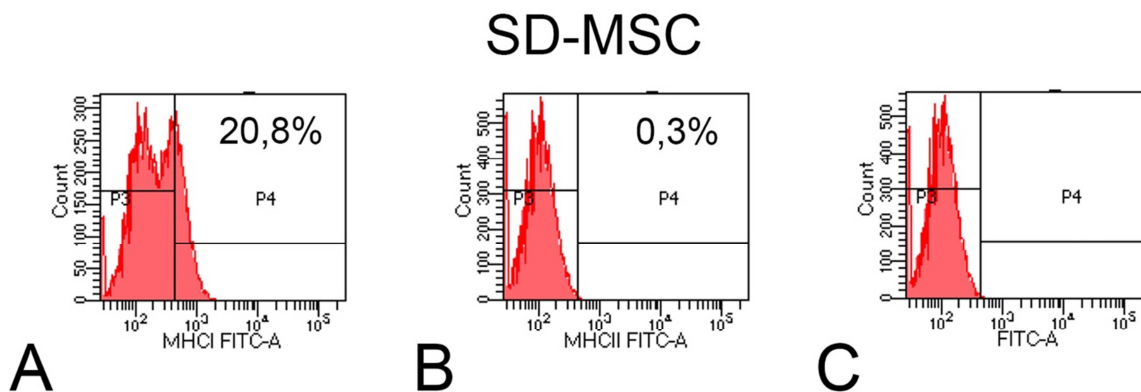


Figura 16. Histogramas e porcentagem de SD-MSC expressando os marcadores de superfície para MHC classe I (A) e classe II (B), assim como células não incubadas com os anticorpos (C).

1.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose

Os sinais de luminescência, gerados pela reação de D-luciferina com a luciferase expressa por SD-MSC e captados pelo IVIS Spectrum (Perkin Elmer) em calvárias de ratos com osteoporose, mostraram que as células estavam presentes em uma área bem delimitada no interior do defeito, enquanto os animais Controle não apresentaram sinais de luminescência (Figura 17A-E). A quantificação da luciferina mostrou que o pico do sinal ocorreu no dia 1 pós injeção de células, reduzindo no dia 3, com uma queda de aproximadamente 73%, continuando a cair aproximadamente mais 12% no dia 5. No dia 8, o sinal detectado foi muito baixo não indicando a presença de células (Figura 17F).

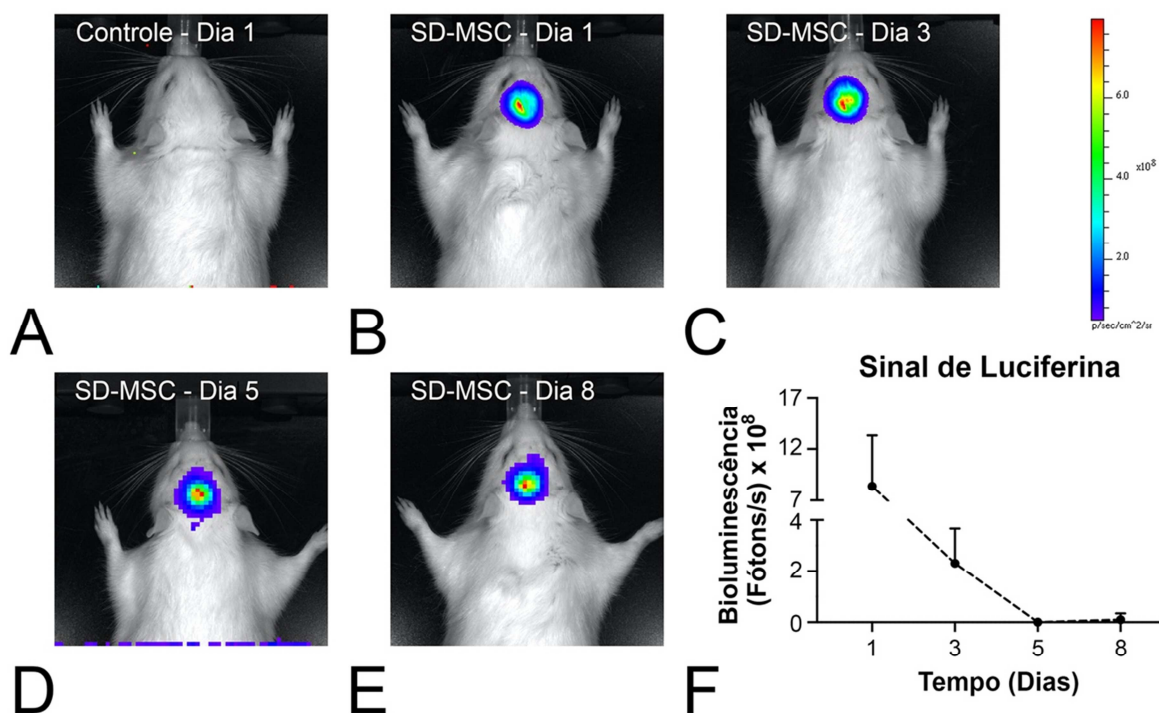


Figura 17. Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD-MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com osteoporose. O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$).

1.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

A análise das reconstruções microtomográficas 3D das calvárias de ratos com osteoporose (Figura 18A, B) mostrou que, após 4 semanas da injeção de células, o tecido ósseo formado estava presente majoritariamente nas margens dos defeitos tratados com injeção de SD-MSC ou PBS. Contudo, houve maior formação óssea nos defeitos de animais tratados com SD-MSC em comparação com os Controles com o tecido ósseo avançando em direção ao centro do defeito (Figura 18A,B).

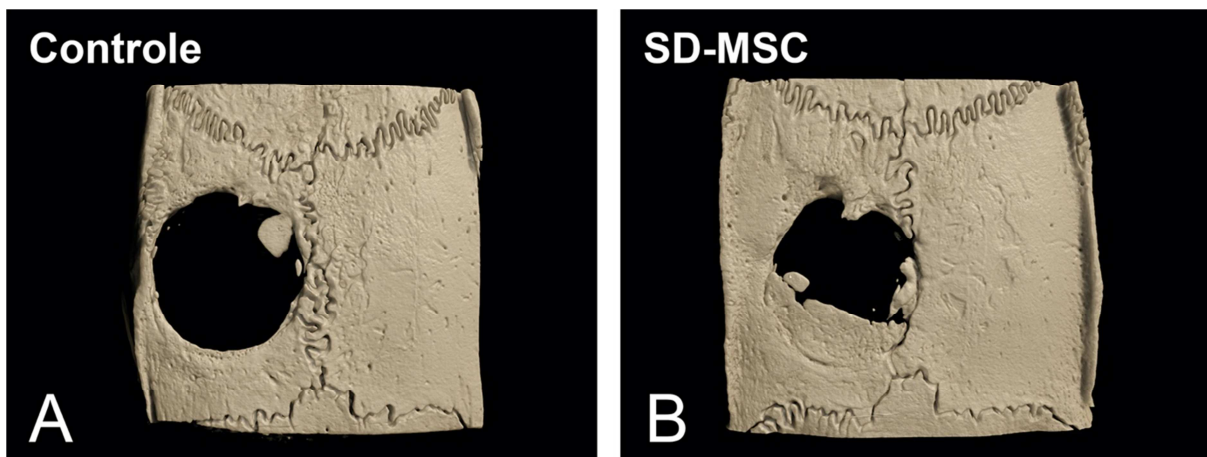


Figura 18. Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas.

As análises morfométricas das calvárias de ratos com osteoporose (Figura 19A-F) mostraram que os parâmetros BV ($p=0,003$), BV/TV ($p=0,002$), BS ($p=0,005$) e Tb.N ($p=0,006$) foram maiores nos defeitos de animais tratados com SD-MSC em comparação com o Controle, enquanto a Tb.Sp foi menor ($p=0,026$). Não houve diferença estatisticamente significativa no parâmetro Tb.Th entre os grupos avaliados ($p=0,327$).

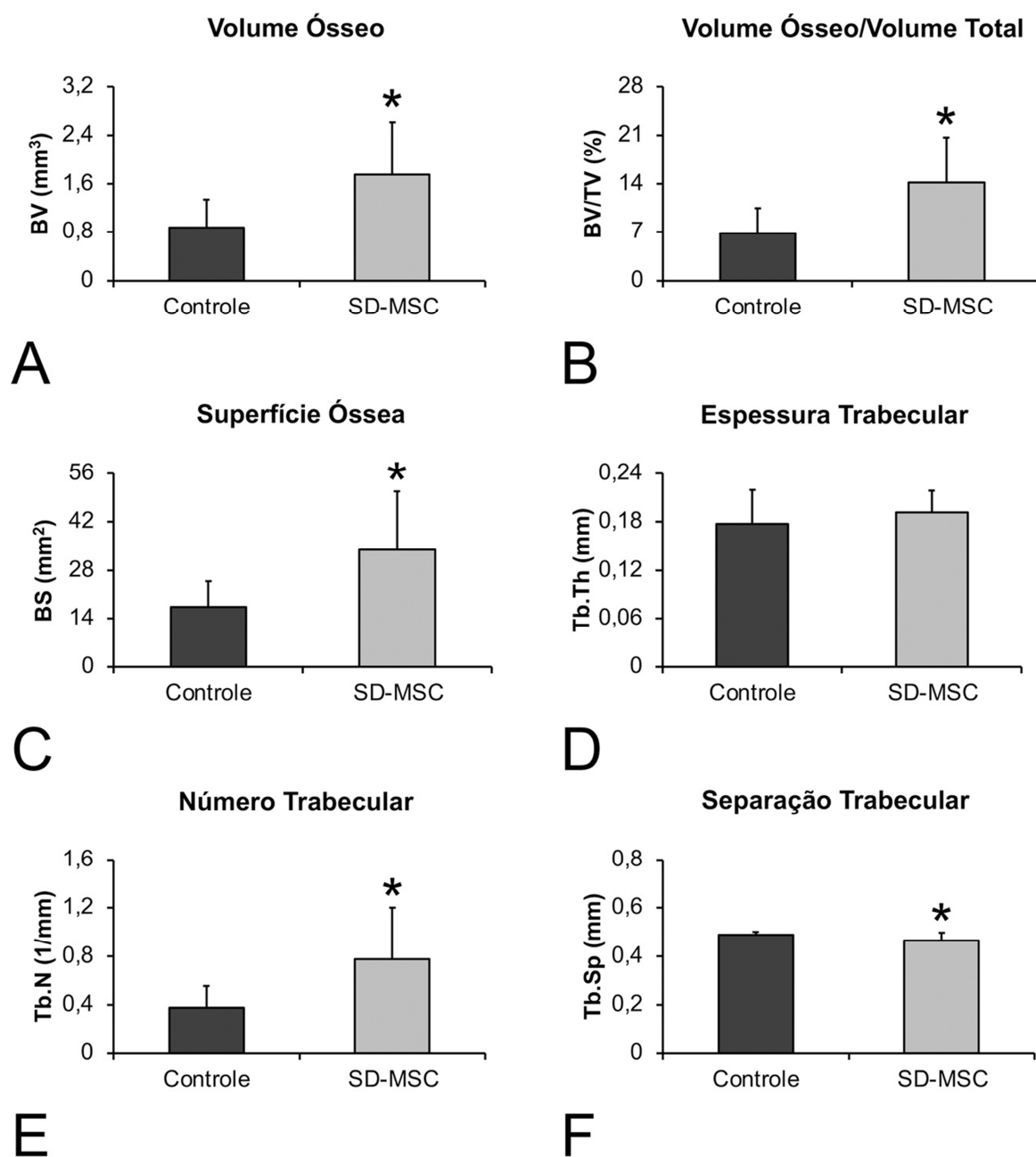


Figura 19. Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=12$).

1.3.4.4 *Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose*

A análise histológica das calvárias de ratos com osteoporose mostrou maior quantidade de tecido ósseo formado nos defeitos tratados com injeção de SD-MSC em relação ao Controle, corroborando os dados morfométricos gerados pela análise de μ CT (Figura 20A,B). Somente no centro dos defeitos tratados com células houve

formação óssea, enquanto que nas margens de todos os defeitos notou-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas, osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea e osso formado (Figura 20C,D), sugerindo que o processo de formação óssea ocorria em todos os defeitos. Além disso, independente do tratamento, o osso formado apresentou características histológicas semelhantes, com tecido ósseo maduro com a presença de linha de cemento e caracterizado por lamelas dispostas paralelamente entre si, e tecido ósseo imaturo (Figura 20C-F). Não foram observados sinais inflamatórios em nenhum dos cortes histológicos.

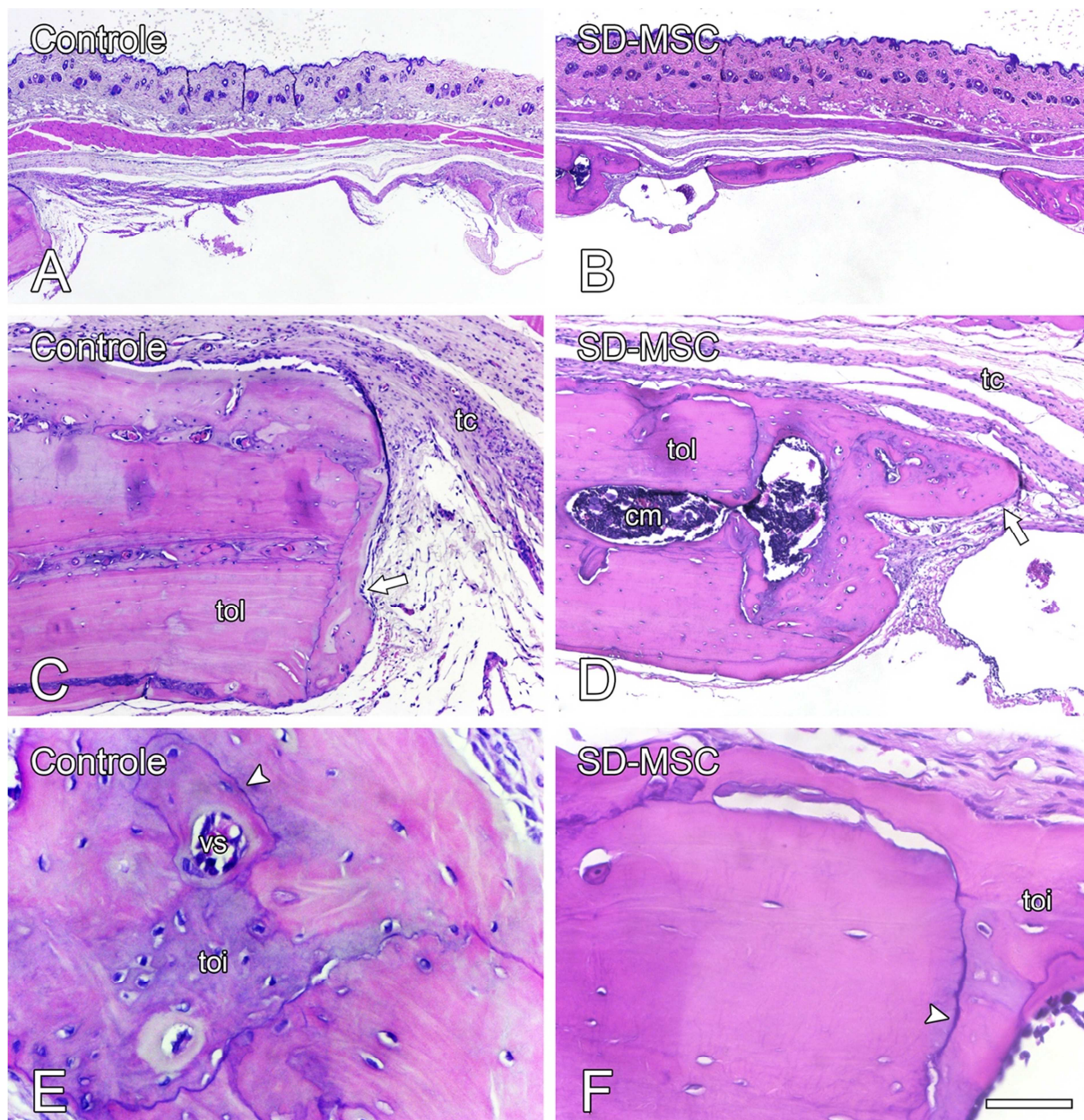


Figura 20. Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. No centro dos defeitos tratados com células houve formação óssea. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cimento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e Eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cimento; cm: canal medular; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar; vs: vaso sanguíneo. Barra de escala: A e B = 800 μm ; C e D = 200 μm ; E e F: 50 μm .

1.3.4.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com osteoporose

Em geral, a expressão relativa dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* foi maior em tecidos colhidos de defeitos tratados com SD-MSC em comparação com o Controle ($p=0,001$, para todos os genes) (Figura 21A-F).

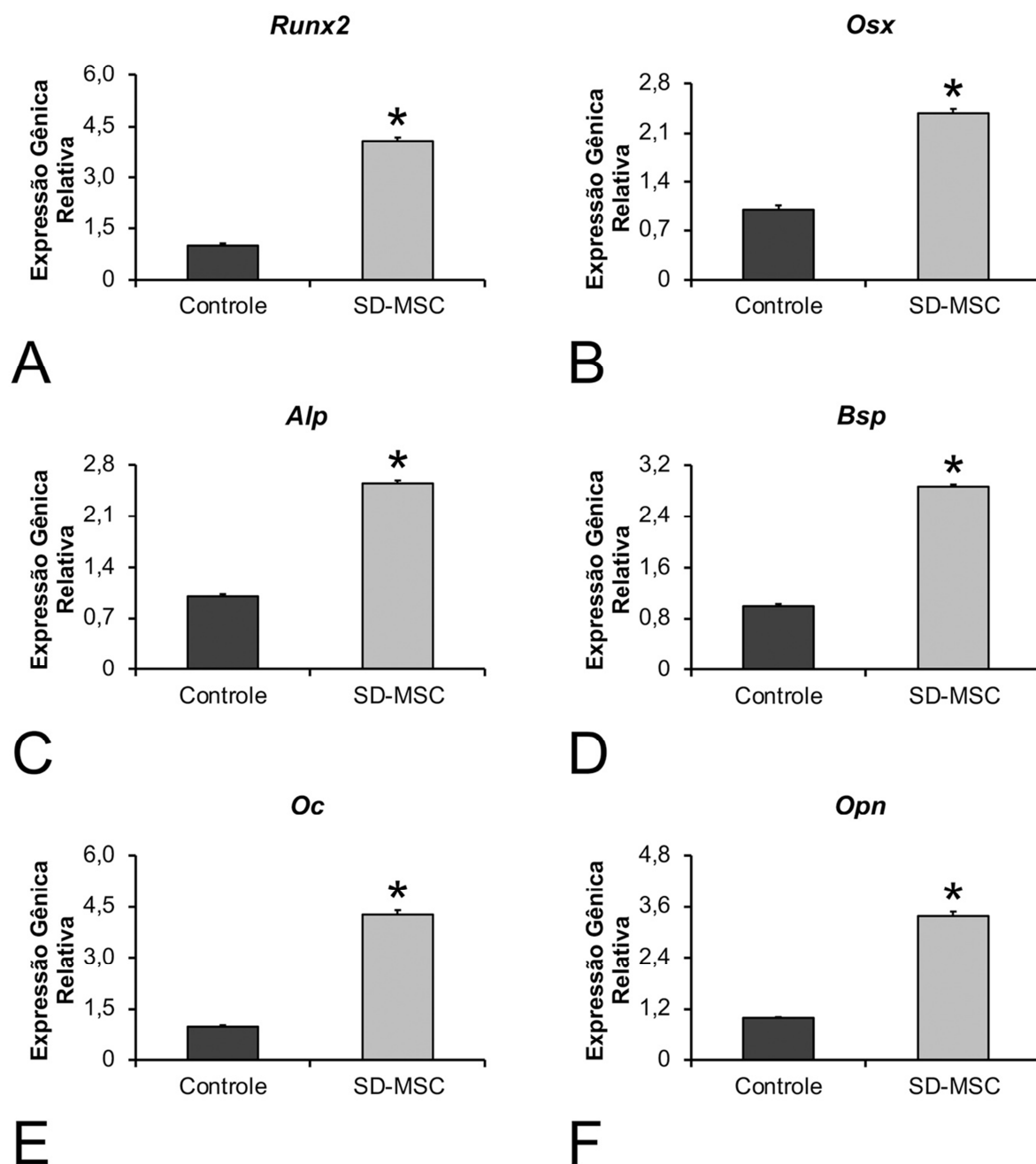


Figura 21. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

1.4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da osteoporose sobre o tecido ósseo in vivo e sobre a diferenciação osteoblástica de MSC in vitro; bem como o efeito da interação entre SD-MSC e ORX-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de ambas as células e a eficácia da terapia celular através de injeção local de SD-MSC para regenerar defeitos ósseos de calvária de ratos acometidos pela osteoporose.

Inicialmente, mostramos que a cirurgia de orquiectomia é um método eficaz para induzir a osteoporose em ratos machos porque as reconstruções 3D dos fêmures dos animais ORX e a análise dos parâmetros morfométricos gerados por μ CT mostraram que o procedimento resultou em efeitos prejudiciais ao tecido ósseo, assim como demonstrado anteriormente (ABUNA et al., 2021; CHIN; IMA-NIRWANA, 2015; ARMADA et al., 2006). É consenso na literatura que a deficiência de testosterona é a principal causa da osteoporose masculina e os ratos ORX têm sido utilizados como modelo para estudos das alterações esqueléticas e do metabolismo ósseo causados por essa doença nesse gênero (CHIN; IMA-NIRWANA, 2012, LELOVAS et al., 2008). Além disso, a osteoporose prejudica a função de MSC endógenas, alterando negativamente sua proliferação e diferenciação (QI et al., 2017).

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que, embora as ORX-MSC possuíssem capacidade de diferenciação osteoblástica, o seu potencial osteogênico foi prejudicado em comparação com SHAM-MSC, como visto através da atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada reduzidas, corroborando com estudos anteriores (LI et al., 2016; SUI et al., 2016; RODRÍGUEZ et al., 1999). Além disso, apesar de ambas as culturas não proliferarem a partir do sétimo dia, o número de ORX-MSC foi menor que SHAM-MSC em todos os períodos de proliferação celular avaliados, semelhante ao observado anteriormente (GOERGEN et al., 2013). Dessa forma, como as MSC contribuem para a manutenção da homeostase óssea sendo fonte de progenitores para os osteoblastos, agentes anabólicos e reguladores da osteoclastogênese (KFOURY; SCADDEN, 2018), os resultados sugerem que, ao menos em parte, a perda óssea na osteoporose pode estar relacionada à redução da capacidade de diferenciação osteoblástica de MSC, semelhante ao observado em outros estudos (BAKER; BOYETTE; TUAN, 2015). Por outro lado, a baixa taxa de proliferação estaria relacionada com a redução da capacidade de

autorrenovação, sugerindo que na medula óssea do modelo in vivo de osteoporose utilizado nesse estudo, pode haver um esgotamento gradual das fontes de MSC, contribuindo para o prejuízo ao tecido ósseo provocado pela doença.

As MSC podem ser uma fonte promissora para terapia celular com vistas ao reparo de defeitos ósseos em pacientes com osteoporose porque quando obtidas de um ambiente saudável e mais jovem, possuem alta capacidade proliferativa e diferenciação com conseqüente aumento do potencial osteogênico (YANG et al., 2018; SZYCHLINSK et al., 2017, BAKER; BOYETTE; TUAN, 2015). Considerando que na terapia celular as MSC podem atuar de forma parácrina (SHAO; ZHANG; YANG, 2015), nesse estudo decidiu-se avaliar in vitro o efeito de SD-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de ORX-MSC e vice-versa através de cocultura indireta.

As SD-MSC e ORX-MSC utilizadas nesse estudo foram obtidas e cultivadas como descrito por Freitas et al. (2020) e caracterizadas como MSC por apresentarem alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem de células expressando os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 e endotelial CD31. Curiosamente, houve baixa porcentagem de células expressando CD44 e CD106, também característicos de MSC. No entanto, outros estudos também obtiveram resultados semelhantes com baixa expressão desses marcadores (YANG et al., 2013). Por mais que a literatura ainda seja divergente em relação aos marcadores de superfície de MSC, há relatos que podem explicar esses resultados de baixa expressão de CD44 e CD106. As condições de cultura, por exemplo, têm influência considerável no fenótipo das células e isso pode contribuir para os resultados divergentes sobre a expressão de diversos marcadores (LV et al., 2014). Particularmente, alguns antígenos podem ser induzidos artificialmente por manipulação e condições de cultura in vitro e a confluência da cultura também pode alterar a expressão de certos marcadores, como o CD106 (LEE et al., 2009). Apesar disso, a literatura é mais clara no ponto em que a expressão combinada de CD29 e CD90 é uma das características fenotípicas de identificação mais consistentes entre as MSC, independentemente das variações das espécies ou condições de cultura (VIEIRA et al., 2010; HARTING et al., 2008).

As avaliações das interações entre SD-MSC e ORX-MSC mostraram que, de maneira geral, todas as coculturas apresentaram o mesmo padrão de crescimento com o número de células aumentando ao longo do tempo, mas isso não influencia a expressão gênica, onde as coculturas ORX-MSC→ORX-MSC apresentaram maior expressão dos marcadores osteoblásticos analisados. É possível que o aumento na

expressão gênica ocorra devido a mecanismos compensatórios das células na tentativa de evitar a perda óssea causada pela osteoporose (IWAMOTO; SEKI, 2015). No entanto, as análises do fenótipo celular confirmaram a menor diferenciação osteoblástica das ORX-MSC como observado pela menor expressão proteica e atividade de ALP e menor formação de matriz mineralizada nas coculturas ORX-MSC→ORX-MSC. Por outro lado, a diferenciação osteoblástica foi recuperada quando as ORX-MSC foram cultivadas na presença de SD-MSC, que por sua vez não foram muito afetadas pela presença das ORX-MSC.

No processo de diferenciação osteoblástica dentro do microambiente controlado de cocultura *in vitro* ou mesmo tecidual *in vivo*, uma célula normalmente recebe e responde a diferentes tipos de moléculas de sinalização que envolvem ligantes, receptores e transdutores. Essa mistura de sinais recebidos simultaneamente por uma célula, são originados de múltiplas vias de sinalização que se interrelacionam e, dependendo do contexto, regulam a transdução uma da outra, resultando em respostas celulares diferentes daquela alcançada por apenas uma única via (MANZARI-TAVAKOLI et al. 2022, ASHE, 2016; ZHANG et al., 2016; ITASAKI; HOPPLER, 2010). Dentre elas destacam-se as vias das BMP, WNT e ITG que regulam a diferenciação osteoblástica e a formação óssea, além de várias outras funções biológicas (TANG et al., 2021; LOPES et al., 2019; KIM et al., 2018; CHEN; DENG; LI, 2012). A análise do PCR array realizado aos 10 dias de cultura mostrou que as interações estudadas afetam as vias de sinalização das BMP, WNT e ITG de maneira complexa e que precisam ser melhores e mais detalhadamente estudadas para o melhor entendimento de como a osteoporose afeta essas vias. Em geral, vários genes das três vias e nas três coculturas foram regulados negativamente confirmando os resultados obtidos nas avaliações da atividade de ALP ao mostrar que a diferenciação osteoblástica de ORX-MSC→ORX-MSC, SD-MSC→ORX-MSC e ORX-MSC→SD-MSC continuou prejudicada. Por outro lado, na via de BMP a expressão de *Col1a2* e na via de WNT as expressões de *Fzd6* e *Wnt5a* foram positivamente reguladas nas interações entre ORX-MSC e SD-MSC, o que pode explicar a recuperação do potencial de mineralização observado nessas culturas, pois é sabido que esses genes atuam na formação da matriz mineralizada (WU et al, 2021; ABUNA et al., 2020; BASCHANT et al., 2016).

Devemos considerar ainda a complexidade da diferenciação osteoblástica, onde muitos genes das vias avaliadas participam de funções biológicas diversas, tais como proliferação, diferenciação e migração celular, desenvolvimento embrionário e

esquelético, formação óssea, remodelação e reparo tecidual, defesa do hospedeiro e hemostasia. (YAN et al., 2022; YU et al., 2021; COSTANTINI et al., 2018; PERSSON et al., 2019; HENDRICKX et al., 2017; DOCHEVA et al., 2014; LIU et al., 2013; MULLIN et al., 2013; KATOH; KATOH, 2007). No futuro, o estudo dessas outras vias abre a possibilidade para manipulação dos genes envolvidos, com objetivo de contrabalancear o efeito negativo que a osteoporose exerce sobre as MSC durante todo o processo de diferenciação osteoblástica.

A ausência de correlação entre os achados genotípicos e fenotípicos encontrada neste estudo pode ser explicada, ao menos em parte, por mecanismos epigenéticos pós-transcricionais que regulam a formação óssea, a integridade esquelética e o desenvolvimento da osteoporose. Participam da regulação desses processos microRNAs, metilação do DNA, modificação pós tradução de histonas e remodelação de cromatina (CHEN et al., 2020; WANG et al., 2016; QIN; BABA; BUTLER, 2004). De fato, recentemente foi mostrado a participação do microRNA miR-425-5p e acetilação de histona H3 no desenvolvimento da osteoporose e na diferenciação osteoblástica de MSC obtidas de ratos com osteoporose (ABUNA et al., 2021, CHEN et al., 2021).

Embora neste estudo não se tenha feito qualquer avaliação para determinar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados de SD-MSD sobre ORX-MSD e vice-versa, considerando que os resultados foram obtidos por meio de experimentos de cocultura, é certo que ocorreram devido ao efeito parácrino. As MSD secretam exossomos, microvesículas, fatores de crescimento, hormônios, citocinas, quimiocinas e proteínas diversas que desempenham papéis críticos nas funções celulares, como proliferação, desenvolvimento, apoptose, diferenciação, replicação, sinalização e angiogênese (HARRELL et al., 2019). Essas moléculas secretadas são liberadas pelas MSD por meio de mecanismos de secreção, como encapsulamento de exossomos e microvesículas, exocitose e translocação de proteínas (SKALNIKOVA et al., 2011).

A terapia celular tem atraído considerável atenção da comunidade científica para o tratamento de diversas condições clínicas em pacientes com osteoporose, ou para tratar a doença em si (JIANG et al., 2021; ARJMAND et al., 2020). Acredita-se que as MSD sejam uma fonte ideal de células para esse tratamento devido às suas propriedades de autorrenovação e plasticidade, que podem reparar ou regenerar tecidos danificados. No entanto, o uso de MSD autólogas em um ambiente clínico desafiador apresenta várias limitações, uma vez que o isolamento dessas células

está associado à morbidade do sítio doador e, quando obtidas de pacientes idosos e/ou doentes, apresentam uma funcionalidade reduzida em termos de seu potencial de proliferação e/ou diferenciação (FIJANY et al., 2019; DUFRANE, 2017; STENDERUP et al., 2003). Nesse contexto, aproveitando suas vantagens, esse estudo utilizou MSC alógenas jovens e saudáveis como estratégia para reparar defeitos ósseos de ratos com osteoporose.

A reação imune é uma limitação importante para o uso clínico de SD-MSC alógenas em terapia celular, o que poderia levar a morte das células injetadas. Essa reação é mediada pela expressão de antígenos MHC classes I e II na superfície das células doadoras que são reconhecidas por células T CD8+ e células T CD4+ do hospedeiro, respectivamente. Os resultados de avaliação da expressão desses complexos em SD-MSC mostraram que houve baixa porcentagem de células expressando ambas as moléculas, permitindo assim que fossem utilizadas com riscos mínimos para os ratos em que foram injetadas. Apesar de haver maior porcentagem de células expressando MHC classe I em comparação com MHC classe II, esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que MSC expressam intrinsecamente MHC classe I, mas não MHC classe II (HUAMAN et al. 2019; WANG et al., 2019). Além disso, assim como apresentado aqui, estudos anteriores utilizando o mesmo modelo experimental mostraram que a utilização de células alógenas foi segura e induziu a formação de tecido ósseo após injeção nos defeitos (ADOLPHO et al., 2022; SOUZA et al., 2020; FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b; SOUZA et al., 2018; FREITAS et al., 2017).

Na terapia celular, observamos que a permanência das células nos defeitos ósseos foi afetada pela doença. Após injeção, as células permaneceram na região dos defeitos ósseos criados na calvária dos ratos com osteoporose por um período de até 5 dias, diferentemente de estudos anteriores, os quais, utilizando ratos saudáveis observaram que as células permaneceram na região dos defeitos por até 14 dias (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Ao menos em parte, esses resultados diferentes podem ser explicados pelo fato que o ambiente doente nos defeitos de ratos com osteoporose pode ser mais hostil às células e além da doença, esses animais eram mais velhos comparados aos animais dos estudos citados anteriormente (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Além disso, estudos relatam que uma vida útil curta das células injetadas também pode ser resultado do estresse físico da injeção, inflamação local, desnutrição e hipóxia

(ROSENSTRAUCH et al., 2005; SORTWELL; PITZER; COLLIER, 2000). Embora os outros fatores não tenham sido avaliados pelo nosso grupo de estudo, certamente o estresse físico da injeção não é um fator relevante porque o método utilizado para injetar as MSC não interfere com sua viabilidade (FREITAS et al., 2019a).

A respeito da formação óssea obtida nos defeitos desses animais, as reconstruções 3D e os parâmetros morfométricos gerados por μ CT mostraram maior formação óssea nos defeitos tratados com injeção local de SD-MSC comparados ao Controle. A normalização do parâmetro BV/TV do tratamento com SD-MSC pelo com PBS, como preconizado por Freitas et al. (2021), é de 2,06, indicando que a formação óssea pelas SD-MSC é duas vezes maior do que a induzida por PBS. Esses resultados estão de acordo com a análise histológica que mostrou tecido ósseo formado nos defeitos que receberam injeção local de células, enquanto no grupo Controle foi observado predominância de tecido conjuntivo. Esses achados são corroborados por outros estudos que utilizaram a mesma estratégia de terapia celular, através de injeção local células em defeitos ósseos criados na calvária de ratos. A utilização de MSC derivadas da medula óssea e do tecido adiposo, ou de osteoblastos diferenciados a partir dessas células, promoveu maior formação óssea (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou MSC do ligamento periodontal ou osteoblastos de calvária (ADOLPHO et al., 2022; SOUZA et al., 2020; SOUZA et al., 2018).

Alguns aspectos moleculares do osso formado através de injeção local de SD-MSC também foram investigados pela expressão gênica de alguns marcadores osteoblásticos, que traduzem proteínas características de formação óssea. A expressão de todos os genes avaliados foi maior nos tecidos formados pela injeção de células em comparação com o Controle, no entanto, nesse estudo não foi avaliada a expressão gênica do osso nativo, portanto, não é possível afirmar se a assinatura molecular do tecido ósseo formado se aproxima ou não daquele original.

Nesse estudo, nós demonstramos que SD-MSC recuperam o potencial osteogênico de ORX-MSC e a terapia celular baseada em injeções locais de SD-MSC foi efetiva em induzir formação óssea significativa, mesmo na presença de osteoporose, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias baseadas em células para regenerar tecido ósseo de pacientes que sofrem de distúrbios metabólicos, como a osteoporose.

1.5 CONCLUSÕES

- A cirurgia de orquiectomia é eficaz em induzir a osteoporose em ratos, a qual prejudica o tecido ósseo e a diferenciação osteoblástica de MSC.
- A diferenciação osteoblástica de ORX-MSC é recuperada quando essas células são cultivadas com SD-MSC, enquanto a diferenciação osteoblástica destas últimas não é afetada quando essas células são cultivadas com ORX-MSC.
- A injeção local de SD-MSC resulta em maior formação óssea comparada à injeção de PBS.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM DIABETES MELLITUS NA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar in vivo o efeito da DM sobre o tecido ósseo.
- Avaliar in vitro o efeito da DM sobre a diferenciação osteoblástica de MSC.
- Avaliar in vitro a influência de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos saudáveis jovens (SD-MSc) sobre a diferenciação osteoblástica de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos com DM (DM-MSc), e destas sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSc, crescidas em condições osteogênicas, utilizando um modelo de cocultura indireta.
- Avaliar in vivo o efeito de injeção local de SD-MSc para regenerar o tecido ósseo de ratos com DM, utilizando um modelo de defeito ósseo criado em calvária.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 *Animais*

Para os experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com aproximadamente 150-200 g e 4 semanas de vida. O número e a distribuição de animais seguiram a descrição abaixo:

- 52 ratos para indução da DM através da administração de estreptozotocina (STZ), dos quais: 6 animais foram utilizados para confirmar o efeito da DM no tecido ósseo (grupo DM); 14 animais foram utilizados para obtenção e cultura de DM-MSc; e 32 animais foram utilizados nos experimentos in vivo.
- 47 ratos que receberam veículo da STZ, normoglicêmicos (NG), dos quais: 6 foram utilizados como Controle para confirmar o efeito da DM no tecido ósseo (grupo NG), 6 foram utilizados para obtenção e cultura de MSC isoladas a partir da medula óssea (NG-MSc), 15 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSc utilizadas nos experimentos de cocultura indireta e 20 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSc para injeção local nos defeitos ósseos criados nos ratos com DM.

2.2.2 Indução da diabetes mellitus

A DM foi induzida em ratos que permaneceram em jejum por 12 horas antes da administração de STZ (Sigma-Aldrich, EUA), um agente diabetogênico que tem efeito tóxico sobre as células β pancreáticas, diminuindo a biossíntese e secreção de insulina e, conseqüentemente, induzindo a hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001; MASIELLO et al., 1998). A STZ foi administrada em uma única aplicação, por via intraperitoneal na dosagem de 60 mg/Kg de peso do animal, diluída em 0,2 mL de tampão citrato 1 M, pH 4,4. Os ratos que receberam injeção de 0,2 mL de tampão citrato 1 M, pH 4,4 sem a presença de STZ, não desenvolveram a DM e, portanto, permaneceram com níveis normais de glicemia. Após 7 dias, a verificação da glicemia dos animais foi realizada através da mensuração dos níveis de glicose circulante utilizando o Accu-Chek Active® (Roche, Suíça), segundo as instruções do fabricante. Foram considerados com DM os ratos que apresentaram níveis circulantes de glicose igual ou superiores a 300 mg/dL. Os níveis de glicose sanguínea considerados normais para a espécie variam de 50 a 135 mg/dL (HARKNESS; WAGNER, 1993). Os animais foram mantidos em número de 3 por caixa no biotério por 42 dias, período após o qual as MSC estão afetadas pela doença (SILVA et al., 2015). Durante esse período, os animais receberam ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, a cada dois dias.

2.2.2.1 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com diabetes mellitus e normoglicêmicos

Ao final de 42 dias após a indução, foram realizados os procedimentos de eutanásia dos animais NG e DM, remoção e fixação dos fêmures, escaneamento em microtomógrafo e obtenção dos parâmetros morfométricos, como descrito no capítulo 1, item 1.2.2.1.

2.2.3 Efeito da diabetes mellitus sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

2.2.3.1 Obtenção e cultura de NG-MSC e DM-MSC

Para avaliar o efeito da DM sobre a diferenciação osteoblástica de MSC, NG-MSC e DM-MSC foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos NG e

com DM, respectivamente. A eutanásia dos animais foi realizada como descrito no capítulo 1, item 1.2.2.1 e os procedimentos de remoção e transporte dos fêmures, obtenção e cultura de células foram realizados como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.1. O cultivo foi realizado durante 7 dias para permitir a seleção de MSC por aderência ao poliestireno e obtenção de células em número suficiente para a realização dos experimentos. Durante esse período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado em a cada 48 horas.

2.2.3.2 Diferenciação osteoblástica de NG-MSC e DM-MSC

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e as células aderidas foram desprendidas e obtida suspensão de células como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2. Em seguida, NG-MSC e DM-MSC foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços contendo meio de expansão na densidade de 10⁴ células/poço. Após 2 dias, tempo necessário para aderência celular, o meio de expansão foi substituído por meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica. As respostas celulares avaliadas foram: proliferação celular, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada. As células foram mantidas e o meio de cultura foi trocado nas mesmas condições como descrito no item 2.2.3.1.

2.2.3.2.1 Proliferação de NG-MSC e DM-MSC

A proliferação de NG-MSC e DM-MSC foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cultura pelo ensaio colorimétrico MTT seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.1.

2.2.3.2.2 Atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC

A atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC foi determinada ao final de 7 e 10 dias de cultura seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.2.

2.2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC

A formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC cultivadas foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) e

quantificada aos 17 dias de cultura, seguindo o mesmo protocolo experimental como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.3.

2.2.4 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de DM-MSC e de DM-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC

2.2.4.1 Obtenção e cultura de SD-MSC e DM-MSC

SD-MSC e DM-MSC foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos saudáveis jovens e com DM, respectivamente, sendo os saudáveis jovens com aproximadamente 4 semanas de vida e 150-200 g. As células foram obtidas e cultivadas como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.1, utilizando meio de expansão normoglicêmico. No entanto, para o transporte de fêmures de alguns animais com DM, obtenção e cultura de DM-MSC, foram seguidos os mesmos tempos e protocolos experimentais, porém, foi utilizado meio de expansão contendo α -MEM com concentração de glicose semelhante à observada nas amostras de sangue de animais com DM, mimetizando assim, um microambiente hiperglicêmico em cultura. Em seguida, foram caracterizadas como MSC por citometria de fluxo e utilizadas nos experimentos de cocultura. SD-MSC foram também utilizadas nos experimentos para avaliar o reparo de defeitos de calvária de ratos com DM.

2.2.4.1.1 Caracterização de DM-MSC por citometria de fluxo

A caracterização por citometria de fluxo de DM-MSC em meio de expansão normoglicêmico ou hiperglicêmico foi realizada utilizando os mesmos anticorpos e protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.1.1.

2.2.4.2 Cocultura indireta de SD-MSC e DM-MSC e diferenciação osteoblástica

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e obtida suspensão de células, como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2. As células foram cultivadas em modelo de cocultura indireta utilizando insertos com filtros porosos de 0,4 μ m (Transwell, Corning Incorporated). Inicialmente, SD-MSC e DM-MSC cultivadas previamente em meio de expansão normoglicêmico e DM-MSC cultivadas previamente em meio de expansão hiperglicêmico, foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços ou insertos, contendo os mesmos tipos de meio, com densidades de plaqueamento de 10^4

células, de forma que os tipos celulares foram cultivados tanto nos insertos como separadamente no fundo dos poços. Para permitir sua aderência, as células foram mantidas separadas durante 2 dias. Após esse período, foi realizada a cocultura indireta substituindo o meio de expansão por meio osteogênico normoglicêmico ou hiperglicêmico para induzir a diferenciação osteoblástica. Os controles foram SD-MSC e DM-MSC, cocultivadas em meio osteogênico normoglicêmico ou hiperglicêmico tanto no inserto quanto no poço, de forma que as coculturas formadas foram SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC (Figura 22). Para avaliação das respostas celulares os insertos foram descartados e as células dos poços foram submetidas às seguintes avaliações: proliferação celular, expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real, expressão proteica de marcadores osteoblásticos por western blot, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada.

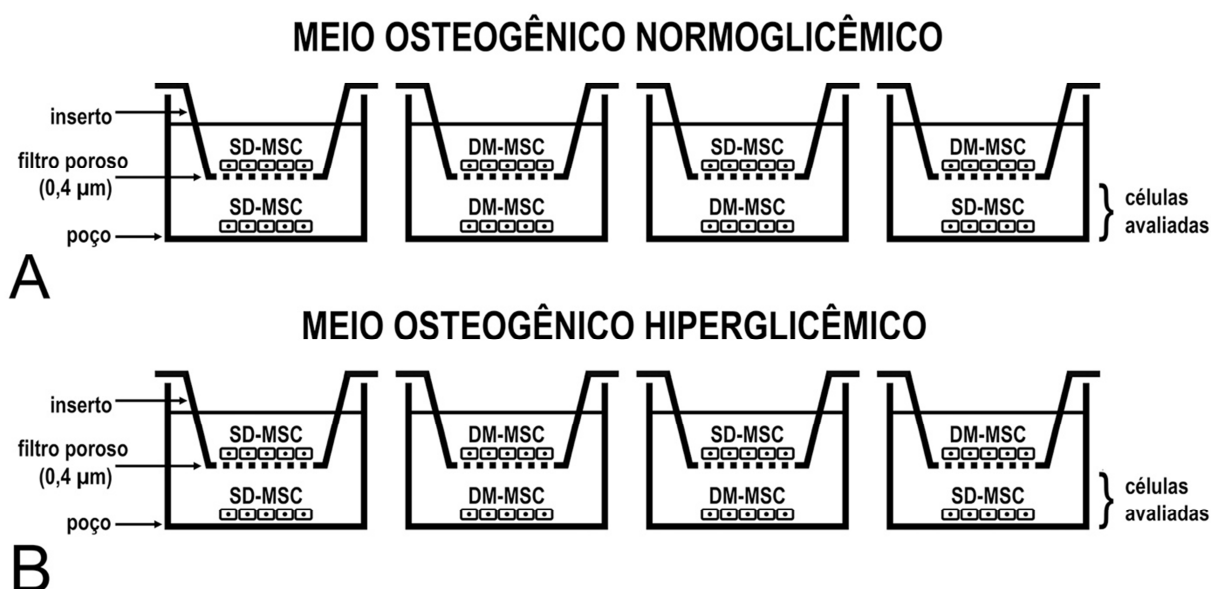


Figura 22. Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e DM-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico normoglicêmico (A) ou hiperglicêmico (B). As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos.

2.2.4.3 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

A proliferação de SD-MSC e DM-MSC foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cocultura indireta em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico pelo ensaio colorimétrico MTT, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.1.

2.2.4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

A expressão gênica de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc*, *Opn* e *Ctnnb1* em SD-MSC e DM-MSC foi avaliada aos 7 e 10 dias de cocultura indireta em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico por PCR em tempo real seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.4.

2.2.4.5 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

A detecção da expressão proteica em SD-MSC e DM-MSC foi realizada por western blot aos 10 dias de cocultura indireta em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.5.

2.2.4.6 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

A atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC foi avaliada ao final de 7 e 10 dias de cocultura indireta em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.2.

2.2.4.7 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

A formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) e quantificada aos 17 dias de cocultura indireta em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.3.

2.2.4.8 Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta

Ao final de 10 dias de cocultura indireta, a análise do perfil de expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de BMP, WNT e ITG durante o processo de diferenciação osteoblástica em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico foi realizado através da técnica PCR array seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.8.

2.2.5 Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

2.2.5.1 Obtenção e cultura de SD-MSC

SD-MSC foram obtidas e cultivadas seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.1.

2.2.5.1.1 Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC

A avaliação da expressão das moléculas do MHC em SD-MSC foi realizada por citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.5.1.1.

2.2.5.2 Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos

Os ratos com DM foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos nas calvárias, 42 dias após a indução da doença, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.2. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram medicados como descrito no capítulo 1, item 1.2.2, e transferidos ao biotério, onde foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, a cada dois dias.

2.2.5.3 Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos

Após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos, os animais foram submetidos a nova intervenção para a injeção de SD-MSC ou PBS seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.5.3.

2.2.5.4 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

A avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos foi realizado como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.4.

2.2.5.5 Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com diabetes mellitus

Os ratos com DM foram divididos em 2 grupos: SD-MSC tratados com injeção de células e Controle, com injeção de PBS, para avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.5.

Decorridas 4 semanas da injeção, foram realizadas a eutanásia, remoção e fixação das calvárias como descrito no capítulo 1, itens 1.2.2.1 e 1.2.5.5, para avaliação do tecido ósseo formado por μ CT, seguida de processamento para análise histológica, ou para avaliação de marcadores osteoblásticos no tecido formado por PCR em tempo real.

2.2.5.6 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

Para avaliar o tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com DM após injeção de PBS ou SD-MSC, as calvárias foram submetidas ao escaneamento em microtomógrafo como descrito no capítulo 1, item 1.2.2.1, e obtenção dos parâmetros morfométricos, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.6.

2.2.5.7 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

Após o escaneamento por μ CT, as amostras foram processadas para histologia como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.7.

2.2.5.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

A avaliação da expressão dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* por PCR em tempo real no tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com DM após injeção de PBS ou SD-MSC foi realizada como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.8.

2.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas como descrito no capítulo 1, item 1.2.6.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efeito da diabetes mellitus no tecido ósseo

O registro da glicemia feito semanalmente, durante 6 semanas, contadas a partir da injeção de STZ ou veículo mostrou que todos os animais que receberam administração de STZ apresentaram níveis circulantes de glicose superiores a 300 mg/dL nas semanas avaliadas, sendo considerados com DM, enquanto os animais que receberam injeção de veículo mantiveram níveis de glicose sanguínea normais para a espécie, sendo considerados como NG (Figura 23).

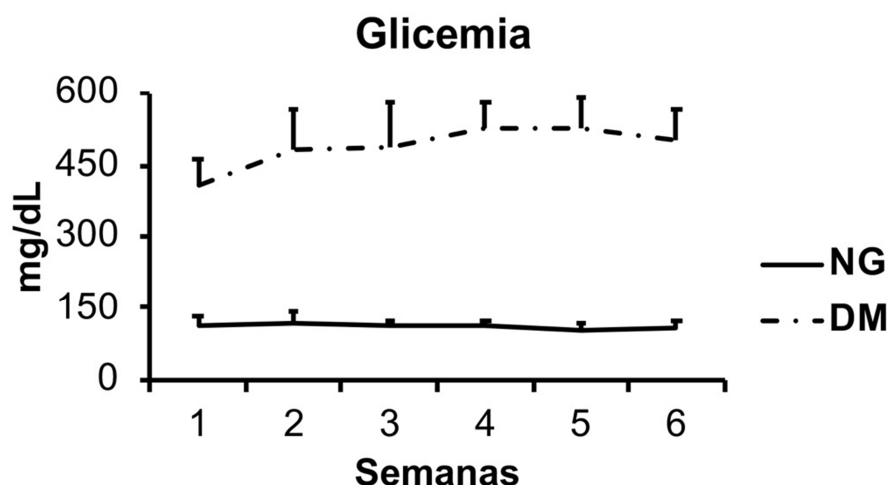


Figura 23. Medidas dos níveis de glicose sanguínea de ratos tratados com STZ (DM) e veículo (NG). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12).

A análise das reconstruções microtomográficas 3D mostrou, após 6 semanas (42 dias) da injeção intraperitoneal de STZ ou veículo, diferenças qualitativas na estrutura óssea da porção distal dos fêmures entre os ratos NG e DM. Nos NG notou-se maior densidade de trabéculas (Figura 24A,B), quando comparados com os DM, nos quais houve redução da densidade trabecular (Figura 24C,D).

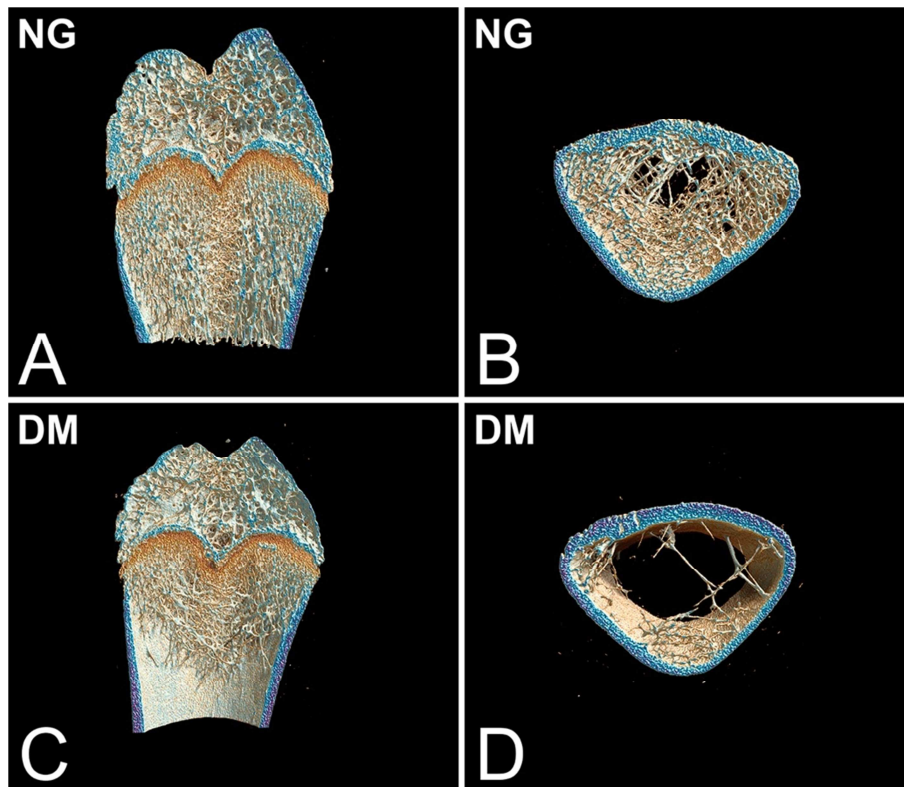


Figura 24. Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos normoglicêmicos (NG; A e B) e com diabetes mellitus (DM; C e D) após 42 dias da injeção intraperitoneal de veículo ou STZ, respectivamente.

As análises morfométricas (Figura 25A-H) mostraram que os parâmetros BV ($p=0,001$), BV/TV ($p=0,002$), BS ($p=0,001$), Tb.Th ($p=0,001$), Tb.N ($p=0,002$), Conn.D ($p=0,002$) e BMD ($p=0,004$) dos ratos DM foram menores comparados com os NG, enquanto a Tb.Sp ($p=0,040$) foi maior.

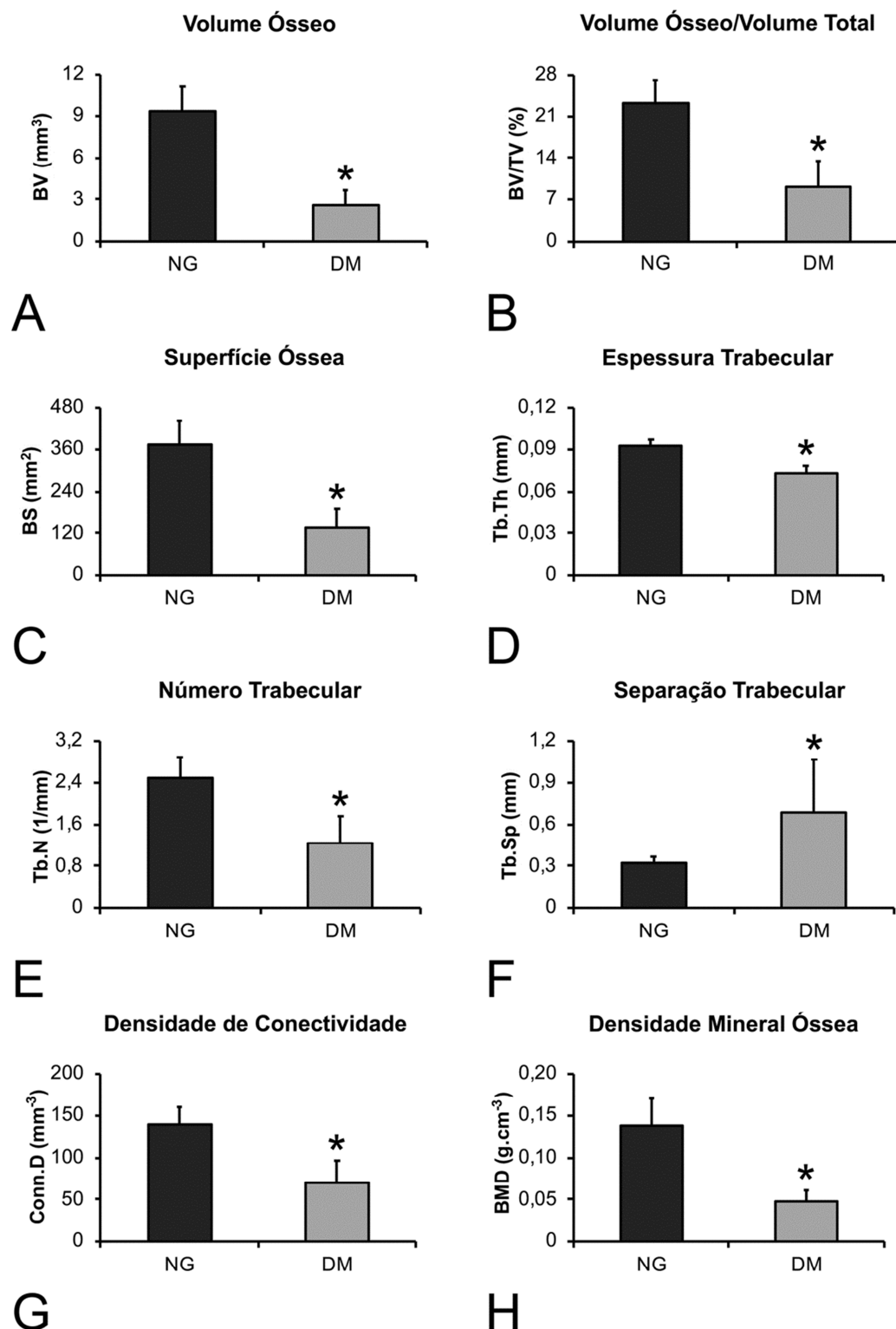


Figura 25. Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos normoglicêmicos (NG) e com diabetes mellitus (DM) após 42 dias da injeção intraperitoneal de veículo ou STZ, respectivamente. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=6$).

2.3.2 Efeito da diabetes mellitus sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

2.3.2.1 Proliferação de NG-MSC e DM-MSC

Os resultados de proliferação de NG-MSC e DM-MSC (Figura 26A) mostraram que as culturas apresentaram comportamento diferente entre si. As NG-MSC proliferaram de 3 para 7 dias, mas não entre 7 e 10 dias ($p=0,001$ e $p=0,482$, respectivamente). As DM-MSC, embora tenham apresentado maior número de células do que as NG-MSC aos 3 dias ($p=0,001$), não proliferaram porque o número de células diminuiu ao longo dos períodos avaliados ($p=0,001$, para todos os períodos).

2.3.2.2 Atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC

Os resultados da atividade de ALP em NG-MSC e DM-MSC (Figura 26B) mostraram que, independentemente dos tipos de culturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias de cultura, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre as culturas avaliadas ($p=0,071$). No entanto, aos 10 dias houve maior atividade de ALP em NG-MSC comparadas às DM-MSC ($p=0,001$).

2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada por NG-MSC e DM-MSC (Figura 26C) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi maior em NG-MSC comparadas às DM-MSC ($p=0,022$).

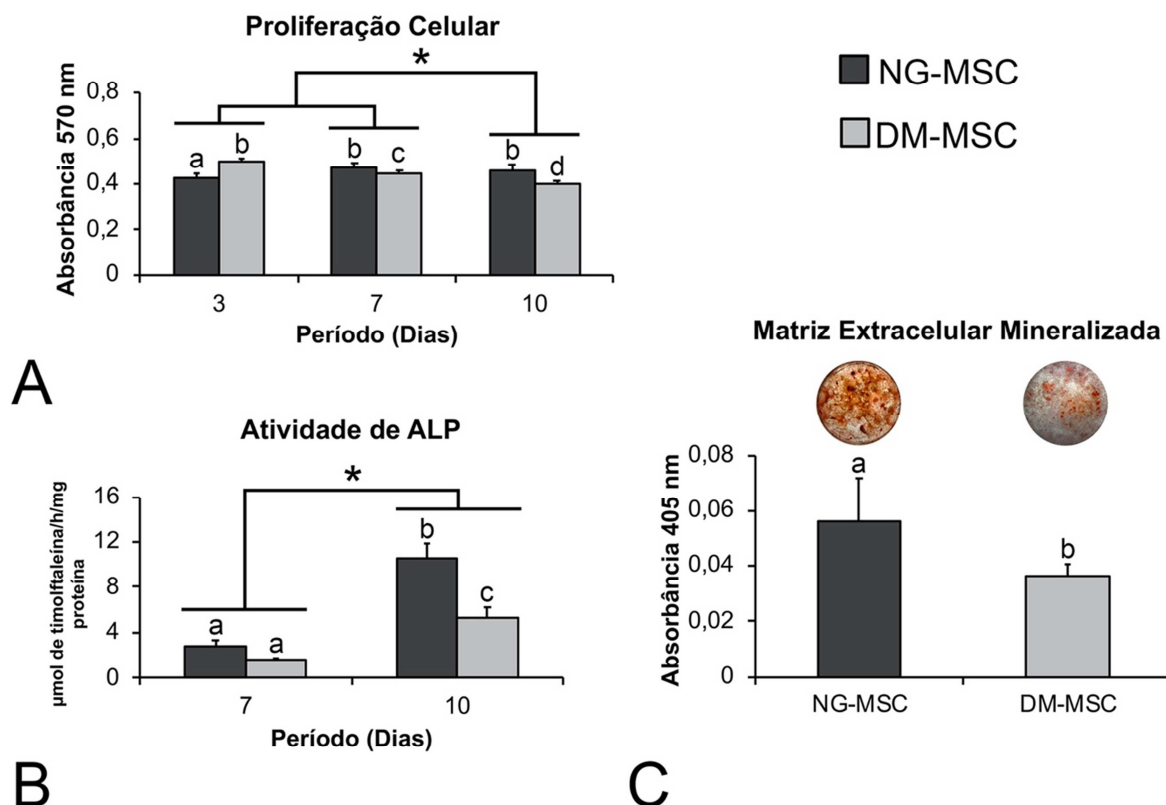


Figura 26. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de NG-MSC e DM-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=5$; $p \leq 0,05$).

2.3.3 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de DM-MSC e de DM-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC cultivadas em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico

2.3.3.1 Caracterização de DM-MSC cultivadas em meio normoglicêmico por citometria de fluxo

Após 7 dias de cultura em meio de expansão normoglicêmico, o perfil de expressão dos marcadores de superfície confirmou que as culturas de DM-MSC apresentaram características de MSC. As culturas apresentaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem expressando CD31, CD34, CD44, CD45 e CD106 (Figura 27A-G).

As SD-MSC utilizadas nas coculturas indiretas descritas nesse capítulo foram caracterizadas previamente por citometria de fluxo e os resultados estão descritos no Capítulo 1, item 1.3.3.1.

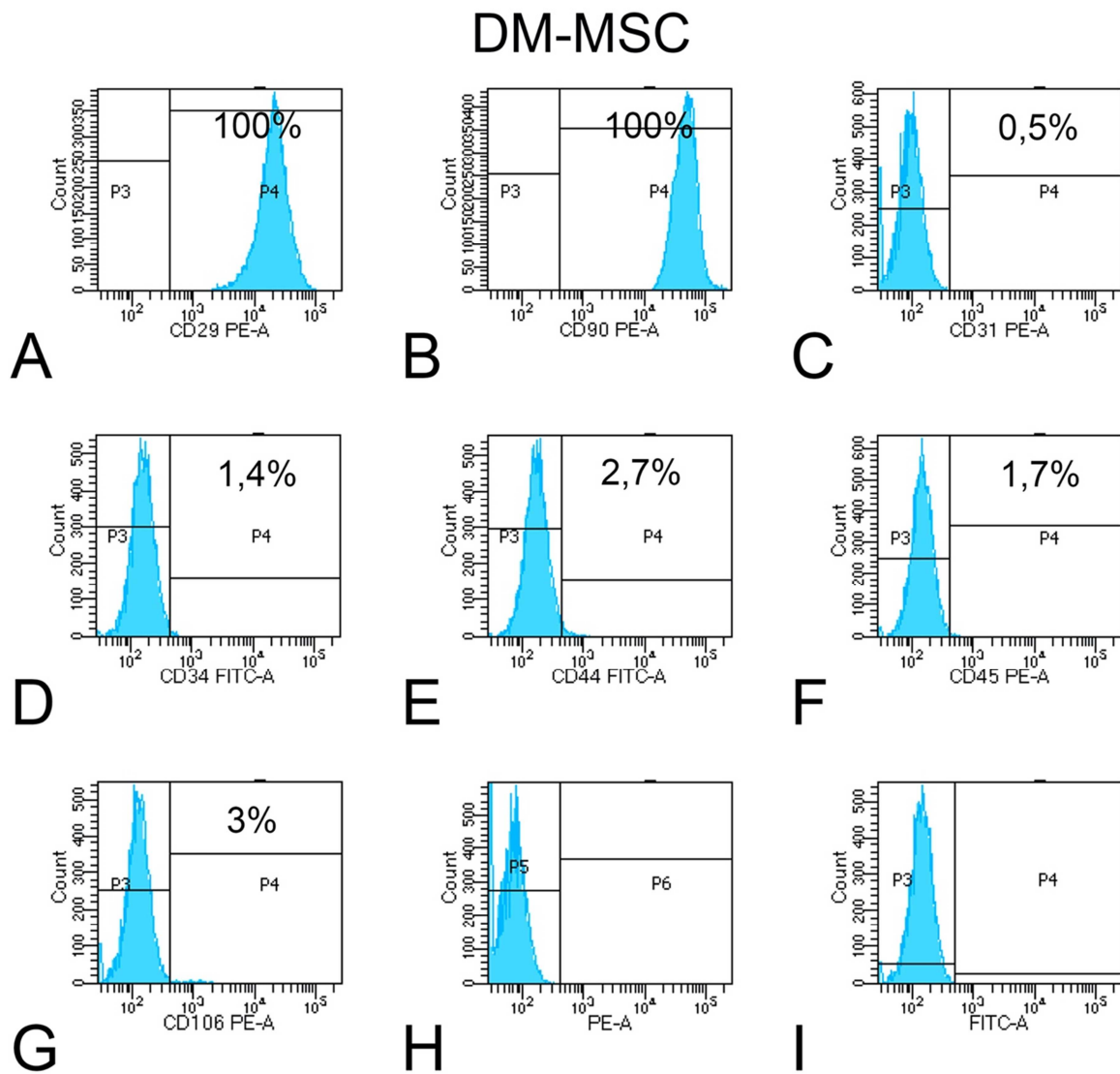


Figura 27. Histogramas e porcentagem de DM-MSC cultivadas em meio de expansão normoglicêmico expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).

2.3.3.2 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico

Os resultados da proliferação (Figura 28) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliadas, houve proliferação celular porque foi observado aumento do número de células de 3 para 7 dias e de 7 para 10 dias ($p=0,001$, para ambos os intervalos). Aos 3 dias de cocultura, SD-MSC→SD-MSC tinha mais células do que SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$), mas ambas não foram diferentes em relação a DM-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, dentre as quais também não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,791$). Aos 7 dias de cocultura não houve diferença estatisticamente significativa entre as coculturas. No entanto, aos 10

dias, havia maior número de células em SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,986$), mas em ambas a quantidade de células foi maior do que em DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,998$).

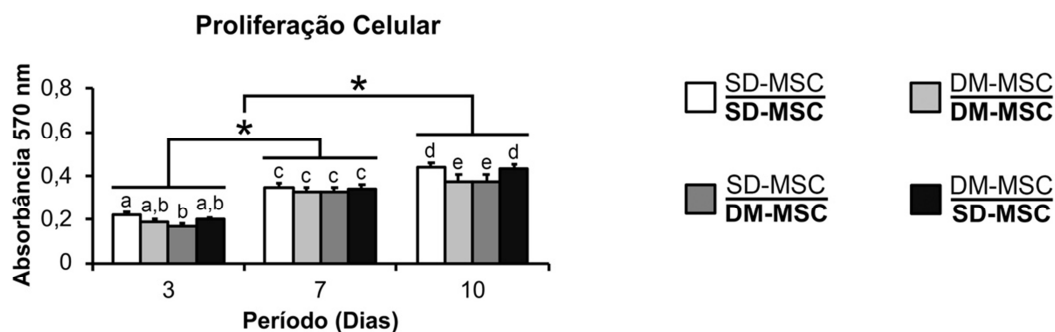


Figura 28. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=5$; $p \leq 0,05$).

2.3.3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico

A expressão relativa do gene *Runx2* (Figura 29A) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,003$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em DM-MSC→DM-MSC quando comparada a SD-MSC→DM-MSC ($p=0,018$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$ e $p=0,003$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,950$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Runx2* não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,757$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas). No mesmo período, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$).

A expressão relativa do gene *Osx* (Figura 29B) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão

relativa de *Osx* foi maior em DM-MSC→DM-MSC quando comparada a SD-MSC→DM-MSC ($p=0,044$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,633$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Osx* não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,141$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,692$).

A expressão relativa do gene *Alp* (Figura 29C) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,006$). Aos 7 dias a expressão relativa de *Alp* não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,053$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,976$). Aos 10 dias a expressão relativa de *Alp* também não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,883$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,455$).

A expressão relativa do gene *Bsp* (Figura 29D) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,038$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em DM-MSC→DM-MSC quando comparada a DM-MSC→SD-MSC ($p=0,004$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→SD-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,003$ e $p=0,023$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,755$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Bsp* não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,601$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas). No mesmo período, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,023$).

A expressão relativa do gene *Oc* (Figura 29E) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa

de *Oc* não foi diferente entre DM-*MSC*→DM-*MSC* e SD-*MSC*→DM-*MSC* ($p=0,889$), mas em ambas foi maior do que SD-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambas) e DM-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,003$ e $p=0,001$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,830$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Oc* não foi diferente entre DM-*MSC*→DM-*MSC* e SD-*MSC*→DM-*MSC* ($p=0,188$), mas em ambas foi maior do que SD-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambas) e DM-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambas). No mesmo período, a expressão relativa de *Oc* foi maior em DM-*MSC*→SD-*MSC* quando comparada a SD-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$).

A expressão relativa do gene *Opn* (Figura 29F) não foi diferente nos dois períodos avaliados, independente dos tipos de coculturas ($p=0,649$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Opn* não foi diferente entre DM-*MSC*→DM-*MSC* e SD-*MSC*→DM-*MSC* ($p=0,943$), mas em ambas foi maior do que SD-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambas) e DM-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,841$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Opn* foi maior em DM-*MSC*→DM-*MSC* quando comparada a SD-*MSC*→DM-*MSC* ($p=0,012$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-*MSC*→SD-*MSC* e DM-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,797$).

A expressão relativa do gene *Ctnnb1* (Figura 29G) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão relativa do gene *Ctnnb1* entre as coculturas. Aos 10 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em DM-*MSC*→DM-*MSC*, quando comparada a SD-*MSC*→SD-*MSC*, SD-*MSC*→DM-*MSC* e DM-*MSC*→SD-*MSC* ($p=0,004$, $p=0,034$ e $p=0,001$, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa).

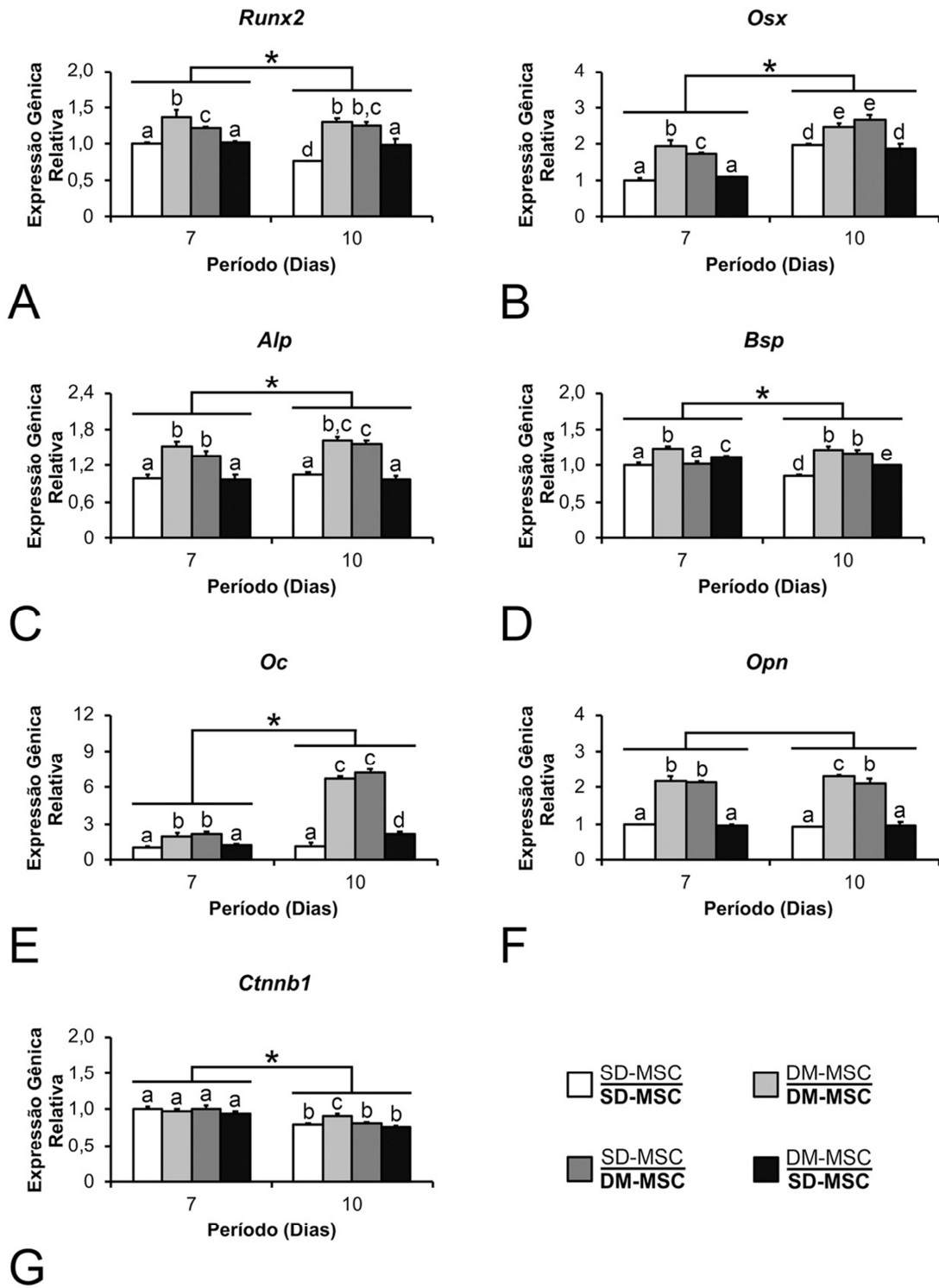


Figura 29. Expressão gênica relativa de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Opn* (F) e *Ctnnb1* (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).

2.3.3.4 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico

A expressão relativa da proteína ALP (Figura 30A) foi maior em SD-MSC→SD-MSC e SD-MSC→DM-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,887$), e menor em DM-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,190$).

A expressão relativa da proteína OPN (Figura 30B) foi maior em SD-MSC→SD-MSC e SD-MSC→DM-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,554$), e menor em DM-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,055$).

2.3.3.5 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico

Os resultados da atividade de ALP (Figura 30C) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias de cocultura, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre as coculturas. No entanto, aos 10 dias, houve maior atividade de ALP em SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$). No mesmo período, a atividade de ALP foi maior em SD-MSC→DM-MSC quando comparada às DM-MSC→DM-MSC ($P=0,003$).

2.3.3.6 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio normoglicêmico

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada (Figura 30D) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi menor em DM-MSC→DM-MSC quando comparada às outras coculturas. Houve maior mineralização em SD-MSC→SD-MSC do que em SD-MSC→DM-MSC ($p=0,020$), mas não quando comparada à DM-MSC→SD-MSC ($p=0,258$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre DM-MSC→SD-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,514$).

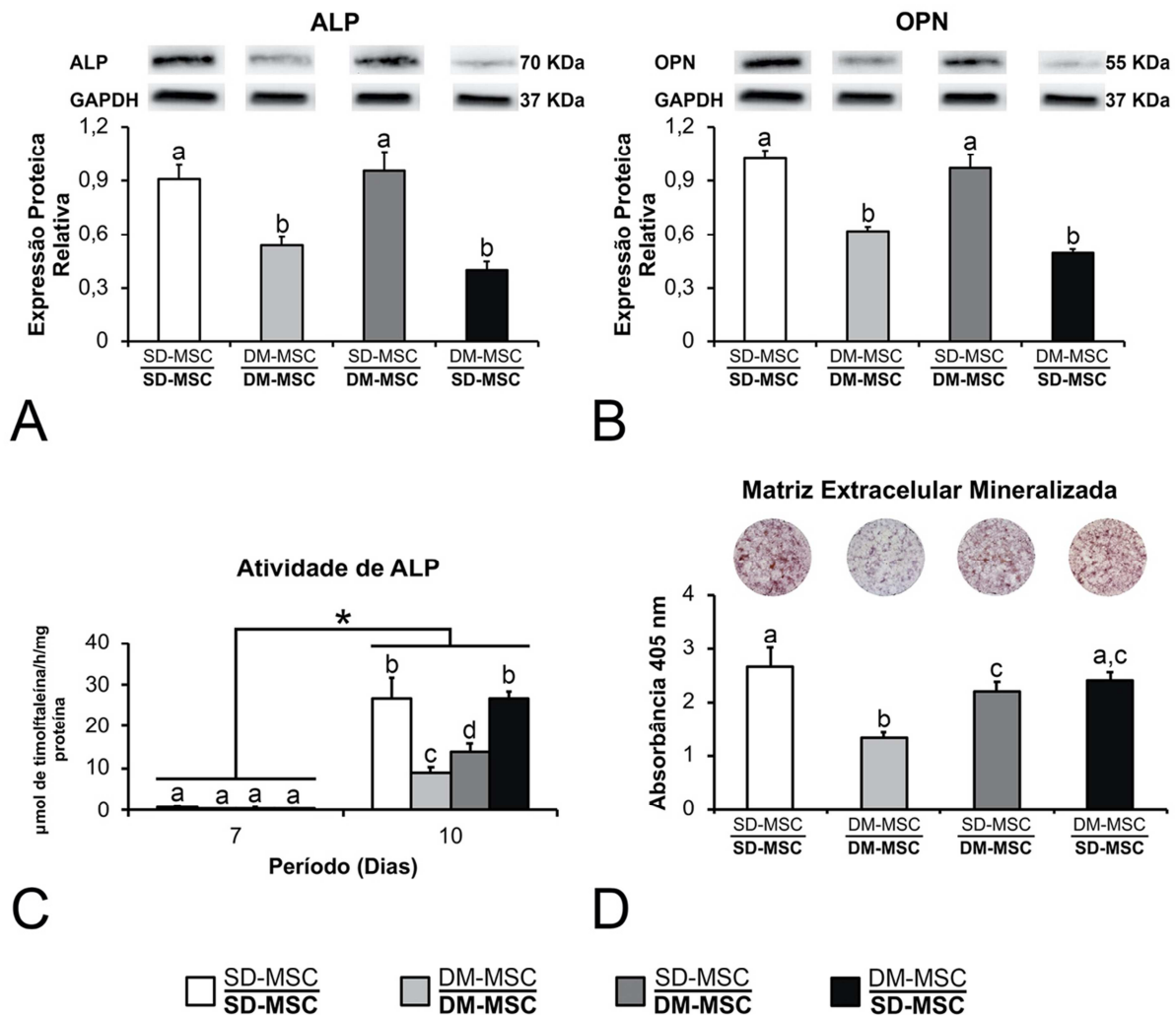


Figura 30. Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=5; p \leq 0,05).

2.3.3.7 Caracterização de DM-MSC cultivadas em meio hiperglicêmico por citometria de fluxo

Após 7 dias de cultura em meio de expansão hiperglicêmico, o perfil de expressão dos marcadores de superfície confirmou que as culturas de DM-MSC apresentaram características de MSC. As culturas apresentaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem expressando CD31, CD34, CD44, CD45 e CD106 (Figura 31A-G).

As SD-MSC utilizadas nas coculturas indiretas descritas nesse capítulo foram caracterizadas previamente por citometria de fluxo e os resultados estão descritos no Capítulo 1, item 1.3.3.1.

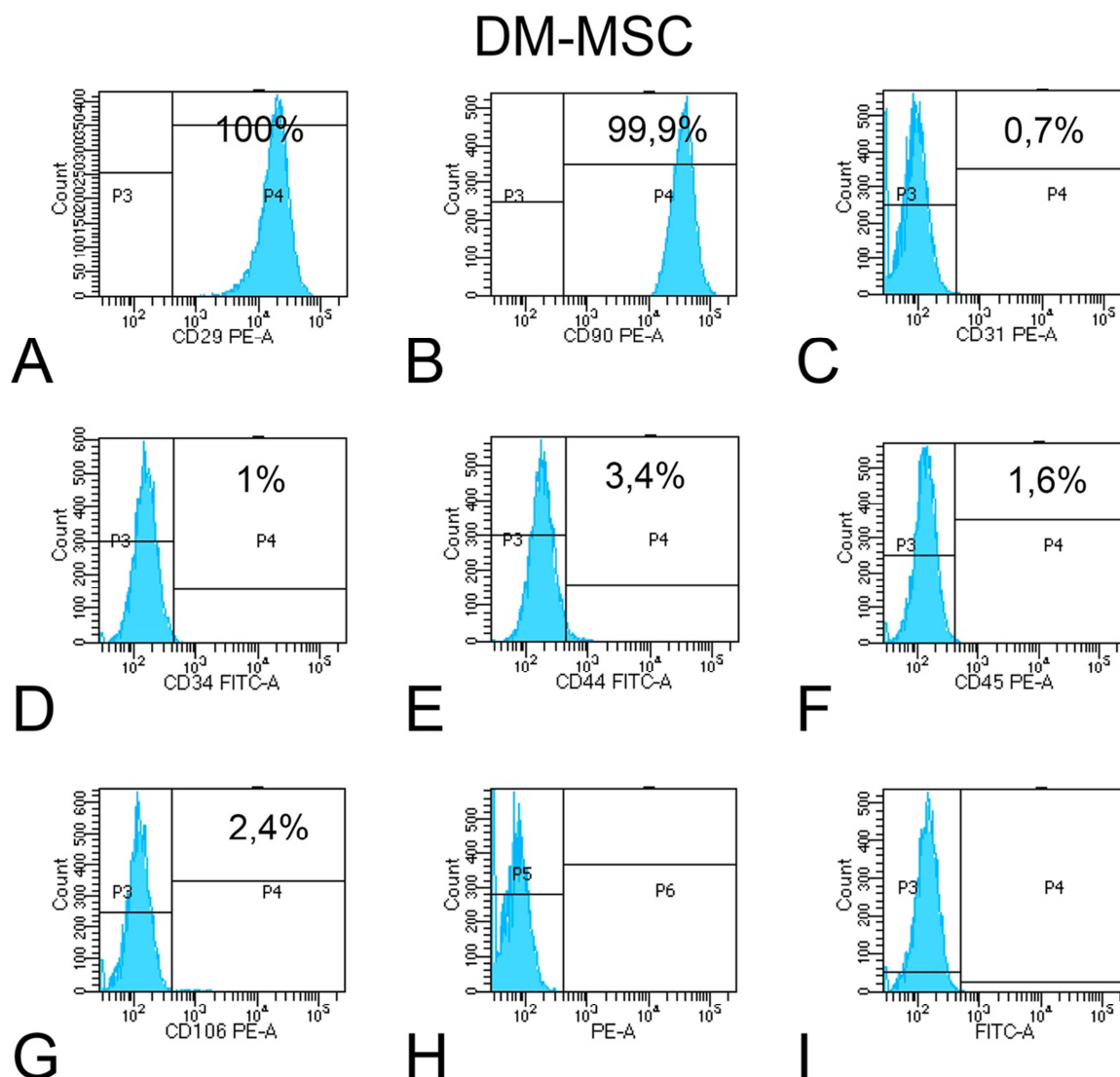


Figura 31. Histogramas e porcentagem de DM-MSC cultivadas em meio de expansão hiperglicêmico expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD31 (C), CD34 (D), CD44 (E), CD45 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).

2.3.3.8 Proliferação de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico

Os resultados da proliferação (Figura 32) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliadas, houve proliferação celular porque foi observado aumento do número de células de 3 para 7 dias, mas não entre 7 e 10 dias ($p=0,001$ e $p=0,163$, respectivamente). Em todos os períodos avaliados havia maior número de células em SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,266$, $p=0,983$ e $p=0,183$, respectivamente), mas em ambas a quantidade de células foi maior do que em SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→DM-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,995$, $p=0,054$ e $p=0,752$, respectivamente).

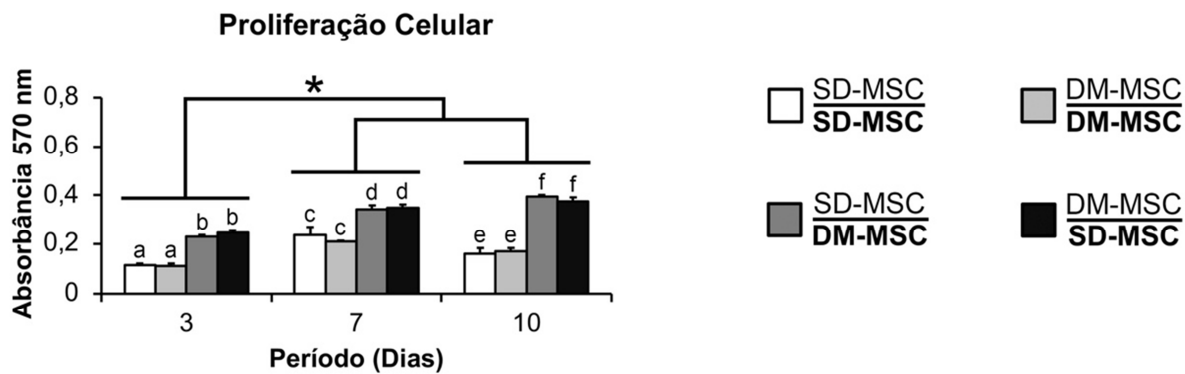


Figura 32. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC, cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=5$; $p\leq 0,05$).

2.3.3.9 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico

A expressão relativa do gene *Runx2* (Figura 33A) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Runx2* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,077$), mas em ambas foi maior do que DM-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,909$).

A expressão relativa do gene *Osx* (Figura 33B) não foi diferente nos dois períodos avaliados, independente dos tipos de coculturas ($p=0,059$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Osx* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,017$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,888$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Osx* também foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,024$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-

MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,901$).

A expressão relativa do gene *Alp* (Figura 33C) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Alp* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,168$), mas em ambas foi maior do que DM-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,998$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Alp* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,895$).

A expressão relativa do gene *Bsp* (Figura 33D) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,020$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Bsp* também foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,978$).

A expressão relativa do gene *Oc* (Figura 33E) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Oc* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,998$), mas em ambas foi maior do que DM-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Oc* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,029$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-

MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$).

A expressão relativa do gene *Opn* (Figura 33F) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Opn* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,883$), mas em ambas foi maior do que DM-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,680$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Opn* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,530$).

A expressão relativa do gene *Ctnnb1* (Figura 33G) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,745$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que foi maior comparada a SD-MSC→DM-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a DM-MSC→DM-MSC ($p=0,019$).

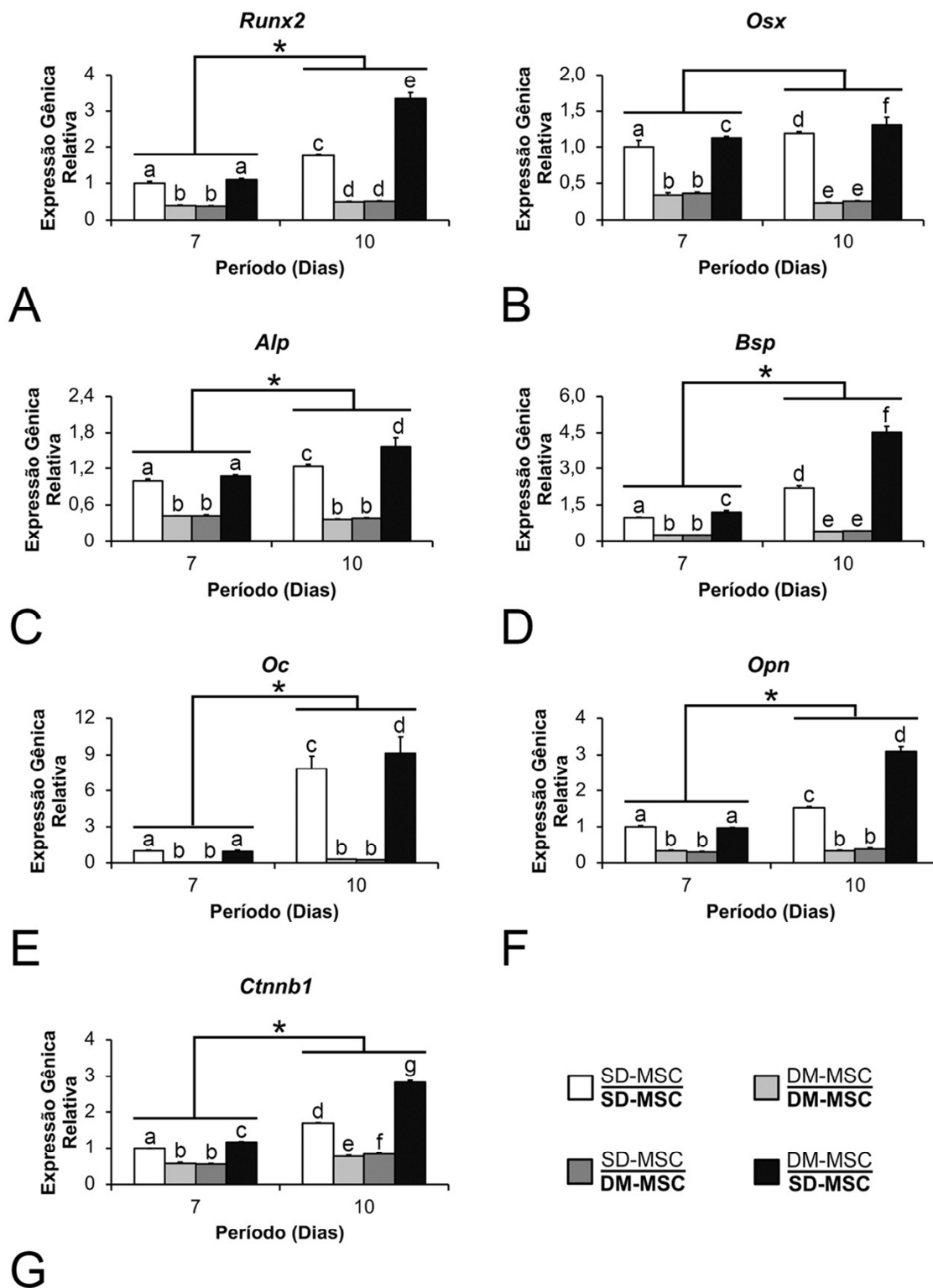


Figura 33. Expressão gênica relativa de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Opn* (F) e *Ctnnb1* (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD- MSC→SD- MSC, DM- MSC→DM- MSC, SD- MSC→DM- MSC e DM- MSC→SD- MSC, cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).

2.3.3.10 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico

A expressão relativa da proteína ALP (Figura 34A) foi maior em em DM-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC, DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,030$, $p=0,049$ e $p=0,011$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa.

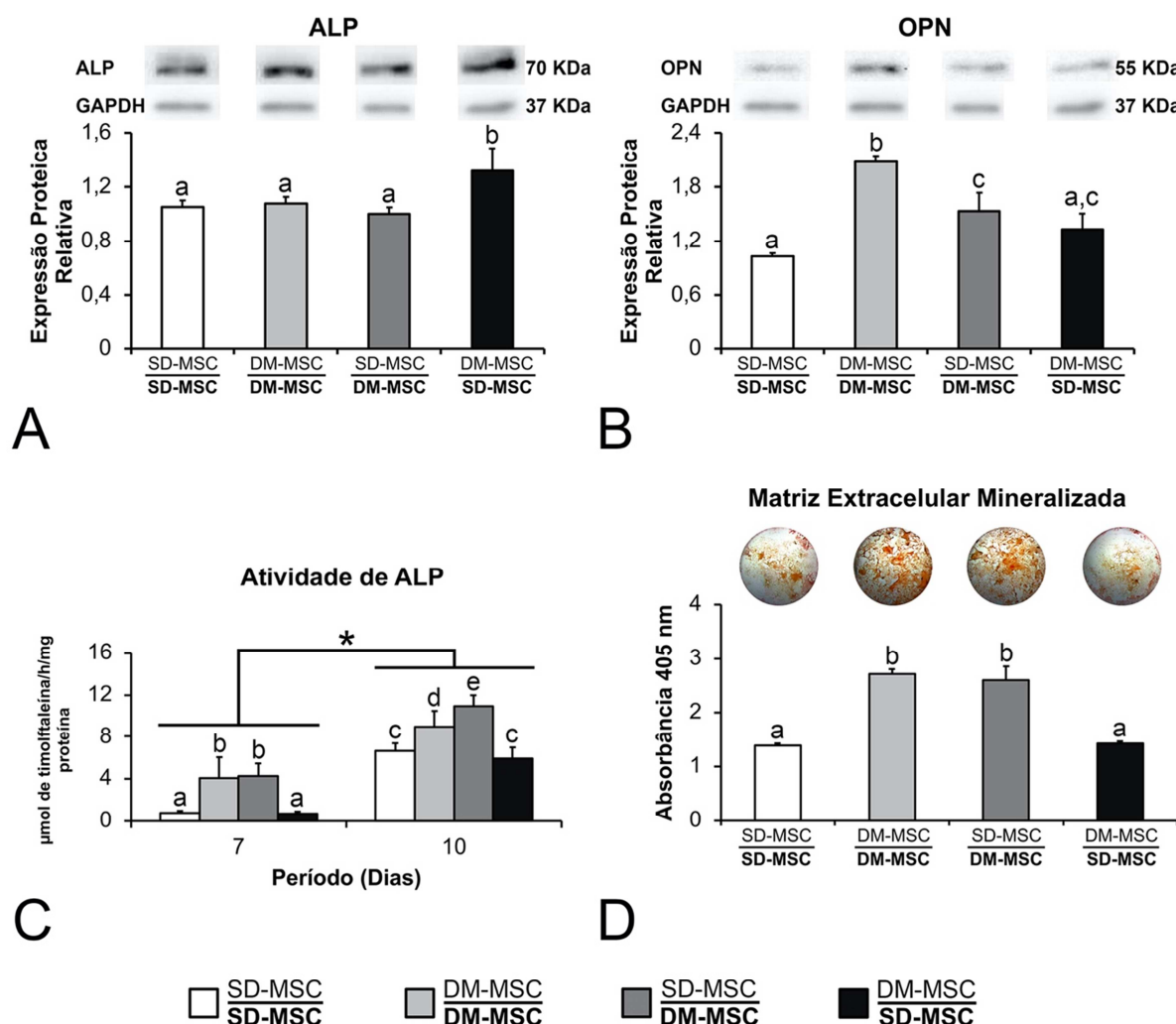
A expressão relativa da proteína OPN (Figura 34B) foi maior em DM-MSC→DM-MSC quando comparada a SD-MSC→DM-MSC ($p=0,006$), que foi maior comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), mas não maior que DM-MSC→SD-MSC ($p=0,339$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,094$).

2.3.3.11 Atividade de ALP em SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico

Os resultados da atividade de ALP (Figura 34C) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias de cocultura houve maior atividade ALP em DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,989$), e menor em SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,999$). Aos 10 dias de cocultura houve maior atividade de ALP em SD-MSC→DM-MSC quando comparada às DM-MSC→DM-MSC ($p=0,045$), que por sua vez foi maior quando comparada às SD-MSC→SD-MSC e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,013$ e $p=0,001$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,776$).

2.3.3.12 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e DM-MSC em cocultura indireta em meio hiperglicêmico

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada (Figura 34D) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que não foi diferente entre DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC ($p=0,513$), mas em ambas foi maior do que SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas) e DM-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,973$).



2.3.3.13 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e DM-MSC cultivadas em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico

Os heatmaps mostram os genes modulados em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico nas vias de sinalização das BMP (Figura 35A), WNT (Figura 36A) e ITG (Figura 37A).

Na via de BMP, dos 63 genes avaliados, 42 foram diferencialmente expressos em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em

comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (Figura 35B). Destes, 3 foram regulados positivamente somente em DM-MSC→DM-MSC, 7 somente em SD-MSC→DM-MSC e 2 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 35C). Enquanto 5 foram regulados negativamente somente em DM-MSC→DM-MSC e 1 somente em SD-MSC→DM-MSC (Figura 35D).

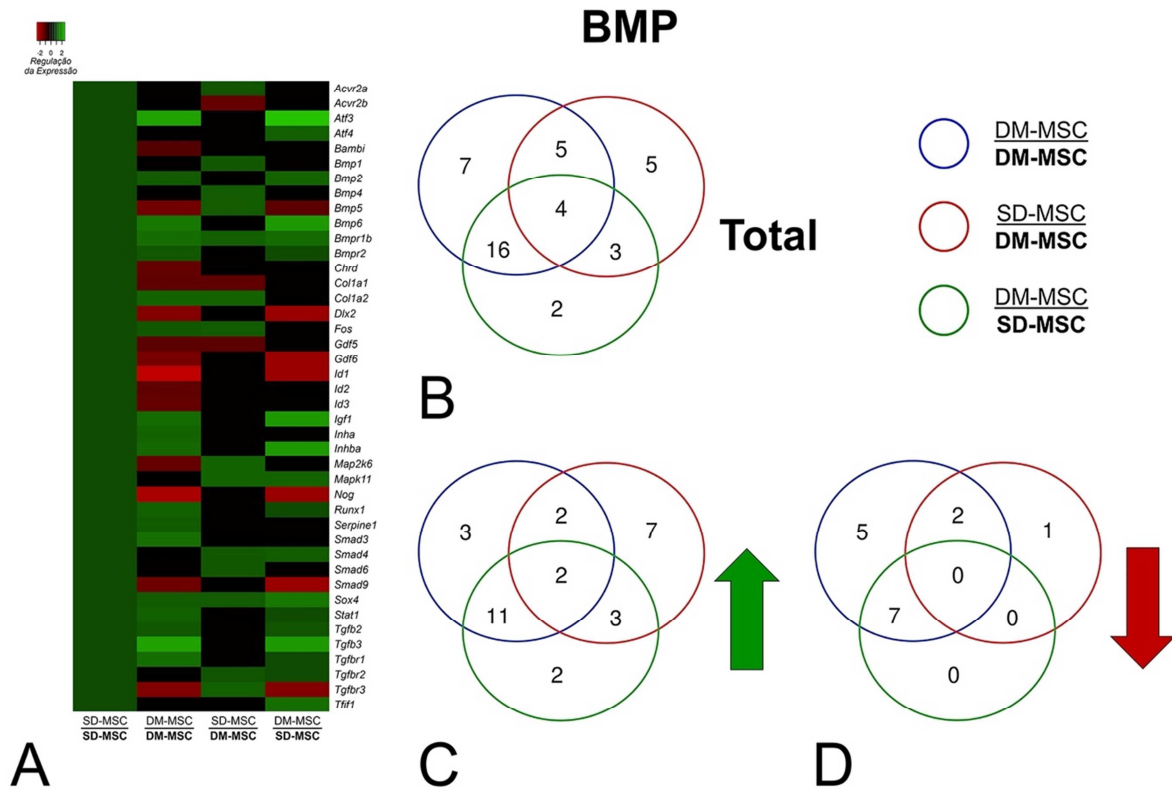


Figura 35. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de WNT, dos 63 genes avaliados, 43 foram diferencialmente expressos em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (Figura 36B). Destes, 3 foram regulados positivamente somente em DM-MSC→DM-MSC, 7 somente em SD-MSC→DM-MSC e 6 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 36C). Enquanto 8 foram regulados negativamente somente em DM-MSC→DM-MSC e 1 somente em SD-MSC→DM-MSC (Figura 36D).

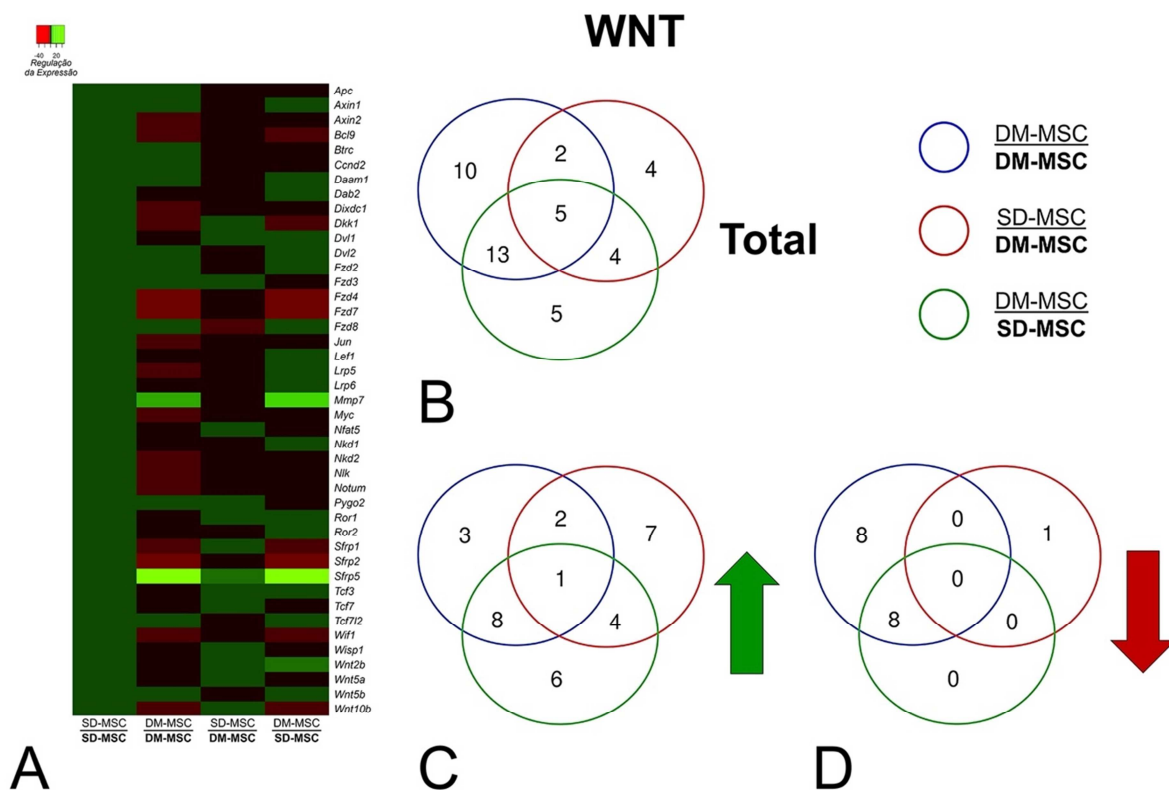


Figura 36. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de ITG, dos 61 genes avaliados, 41 foram diferencialmente expressos em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (Figura 37B). Destes, 2 foram regulados positivamente somente em DM-MSC→DM-MSC, 4 somente em SD-MSC→DM-MSC e 6 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 37C). Enquanto 10 foram regulados negativamente somente em DM-MSC→DM-MSC e 2 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 37D).

Os genes regulados positiva ou negativamente são mostrados na Tabela 4.

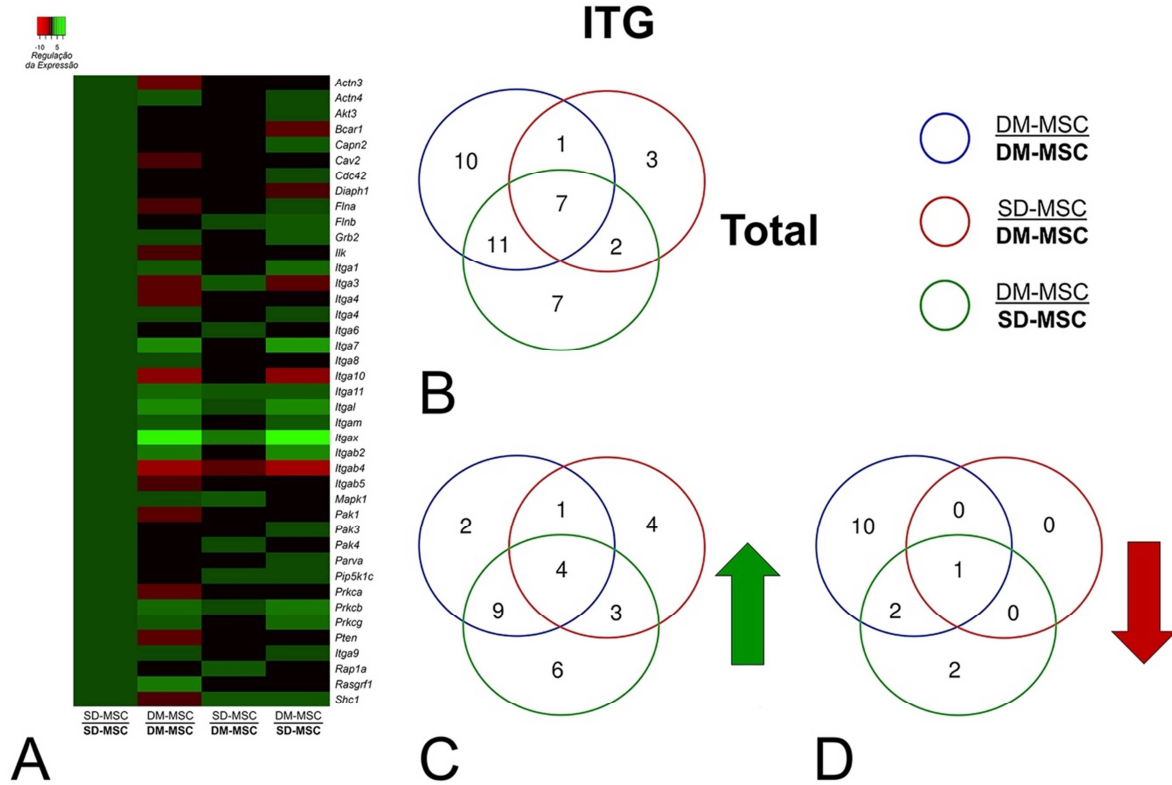


Figura 37. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Tabela 4. Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC

Via	Coculturas	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
BMP	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Bmpr1b, Sox4</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC	<i>Col1a2, Fos</i>	<i>Col1a1, Gdf5</i>
	DM-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Atf3, Bmp2, Bmp6, Bmpr2, Igf1, Inhba, Runx1, Stat1, Tgfb2, Tgfb3, Tgfbr1</i>	<i>Bmp5, Dlx2, Gdf6, Id1, Nog, Smad9, Tgfbr3</i>
	SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Mapk11, Smad4, Tgfbr2</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC	<i>Inha, Serpine1, Smad3</i>	<i>Bambi, Chrd Id2, Id3, Map2k6</i>
	SD-MSC→DM-MSC	<i>Acvr2a, Bmp1, Bmp4, Bmp5, Map2k6, Smad6, Tgfbr3</i>	<i>Acvr2b</i>
	DM-MSC→SD-MSC	<i>Atf4, Tff1</i>	-
WNT	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Sfrp5</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC	<i>Fzd3, Pygo2</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Axin1, Daam1, Dvl2, Fzd2, Fzd8, Mmp7, Tcf7l2, Wnt5b</i>	<i>Bcl9, Dkk1, Fzd4, Fzd7, Sfrp1, Sfrp2, Wif1, Wnt10b</i>
	SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Dvl1, Ror1, Tcf3, Wnt2b</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC	<i>Apc, Btrc, Ccnd2</i>	<i>Axin2, Dixdc1, Jun, Lrp5, Myc, Nkd2, Nlk, Notum</i>
	SD-MSC→DM-MSC	<i>Dkk1, Nfat5, Sfrp1, Tcf7, Wisp1, Wnt5a, Wnt10b</i>	<i>Fzd8</i>
	DM-MSC→SD-MSC	<i>Dab2, Lef1, Lrp5, Lrp6, Nkd1, Ror2</i>	-
ITG	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Itga11, Itgal, Itgax, Prkcb</i>	<i>Itgb4</i>
	DM-MSC→DM-MSC SD-MSC→DM-MSC	<i>Mapk1</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Actn4, Grb2, Itga1, Itga5, Itga7, Itga9, Itgam, Itgb2, Prkcg</i>	<i>Itga3, Itga10</i>
	SD-MSC→DM-MSC DM-MSC→SD-MSC	<i>Flnb, Pip5k1c, Shc1</i>	-
	DM-MSC→DM-MSC	<i>Itga8, Rasgrf1</i>	<i>Actn3, Cav2, Flna, Ilk, Itga4, Itgb5, Pak1, Prkca, Pten, Shc1</i>
	SD-MSC→DM-MSC	<i>Itga3, Itga6, Pak4, Rap1a</i>	-
	DM-MSC→SD-MSC	<i>Akt3, Capn2, Cdc42, Flna, Pak3, Parva</i>	<i>Bcar1, Diaph1</i>

Os heatmaps mostram os genes modulados em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico nas vias de sinalização das BMP (Figura 38A), WNT (Figura 39A) e ITG (Figura 40A).

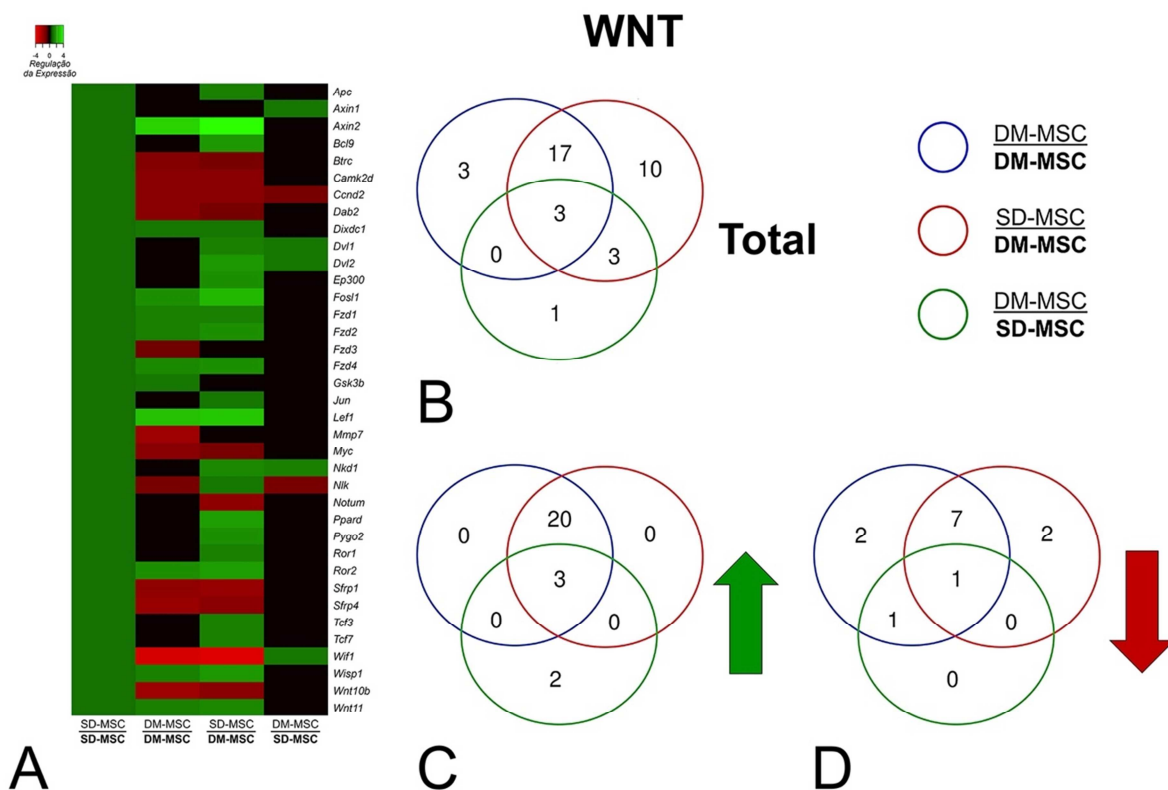


Figura 39. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de ITG dos 61 genes avaliados, 44 foram diferencialmente expressos em DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico (Figura 40B). Destes, 2 foram regulados positivamente somente em DM-MSC→DM-MSC, 13 somente em SD-MSC→DM-MSC e 1 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 40C). Enquanto 2 foram regulados negativamente somente em DM-MSC→DM-MSC, 2 somente em SD-MSC→DM-MSC e 1 somente em DM-MSC→SD-MSC (Figura 40D).

Os genes regulados positiva ou negativamente são mostrados na Tabela 5.

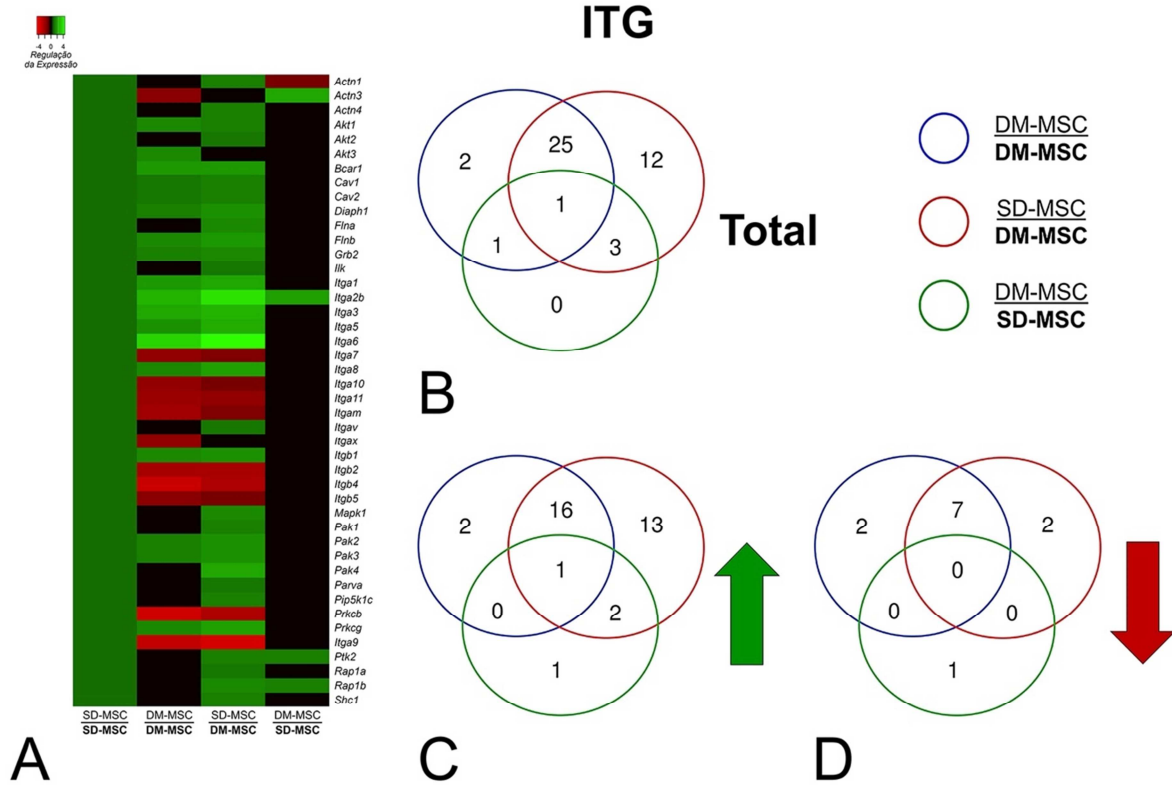


Figura 40. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre DM-MSC→DM-MSC, SD-MSC→DM-MSC e DM-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Tabela 5. Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre DM-*MSC*→DM-*MSC*, SD-*MSC*→DM-*MSC* e DM-*MSC*→SD-*MSC* cultivadas em meio osteogênico hiperglicêmico em comparação com SD-*MSC*→SD-*MSC*

Via	Coculturas	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
BMP	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Bmp6, Mapk11</i>	-
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Acvr11, Atf4, Bmpr1b, Col1a2, Id1, Id3, Inhba, Mapk14, Runx1, Serpine1, Stat1, Tff1, Tgfb3, Tgfb3, Smad4, Sox4</i>	<i>Bmp3, Eng, Igf1, Map2k6, Nog, Smad3</i>
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	-	<i>Map3k7, Tgfb1</i>
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Ifrd1</i>	<i>Bmp1, Bmp4, Col1a1, Gdf6, Inha, Tgfb2</i>
	SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Bmpr1a, Col1a1, Dnaja1, Fos, Map2k3, Map3k7, Smad5, Smad7, Tgfb2</i>	-
	DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Smad3, Smad9</i>	<i>Smad1</i>
WNT	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Dvl1, Dvl2, Nkd1</i>	<i>Ccnd2</i>
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Apc, Axin2, Bcl9, Dixdc1, Ep300, Fosl1, Fzd1, Fzd2, Fzd4, Jun, Lef1, Nlk, Ppard, Pygo2, Ror1, Ror2, Tcf3, Tcf7, Wisp1, Wnt11</i>	<i>Btrc, Camk2d, Dab2, Sfrp1, Sfrp4, Wif1, Myc</i>
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	-	<i>Nlk</i>
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	-	<i>Fzd3, Mmp7</i>
	SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	-	<i>Notum, Wnt10b</i>
	DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Axin1, Wif1</i>	-
ITG	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Itga2b</i>	-
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Akt1, Bcar1, Cav1, Cav2, Diaph1, Flnb, Grb2, Itga1, Itga3, Itga5, Itga6, Itga8, Itgb1, Pak2, Pak3, Prkcg</i>	<i>Itga9, Itga10, Itga11, Itgam, Itgb2, Itgb4, Prkcb</i>
	SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i> DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Ptk2, Rap1b</i>	-
	DM- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Akt3, Itga7</i>	<i>Actn3, Itgax</i>
	SD- <i>MSC</i> →DM- <i>MSC</i>	<i>Actn1, Actn4, Akt2, Flna, Ilk, Itgav, Mapk1, Pak1, Pak4, Parva, Pip5k1c, Rap1a, Shc1</i>	<i>Itga7, Itgb5</i>
	DM- <i>MSC</i> →SD- <i>MSC</i>	<i>Actn3</i>	<i>Actn1</i>

2.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

2.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC

As SD-MSC utilizadas para o tratamento dos defeitos ósseos descritas nesse capítulo foram analisadas previamente quanto a expressão das moléculas do MHC classes I e II por citometria de fluxo e os resultados estão descritos no Capítulo 1, item 1.3.4.1.

2.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

Os sinais de luminescência, gerados pela reação de D-luciferina com a luciferase expressa por SD-MSC e captados pelo IVIS Spectrum (Perkin Elmer) em calvárias de ratos com DM, mostraram que as células estavam presentes em uma área bem delimitada no interior do defeito, enquanto os animais Controle não apresentaram sinais de luminescência (Figura 41A-E). A quantificação da luciferina caiu progressivamente, de forma que o pico do sinal ocorreu no dia 1 pós injeção de células, reduzindo no dia 3, com uma queda de aproximadamente 88%, continuando a cair aproximadamente mais 10% no dia 5. No dia 8, o sinal detectado foi muito baixo não indicando a presença de células (Figura 41F).

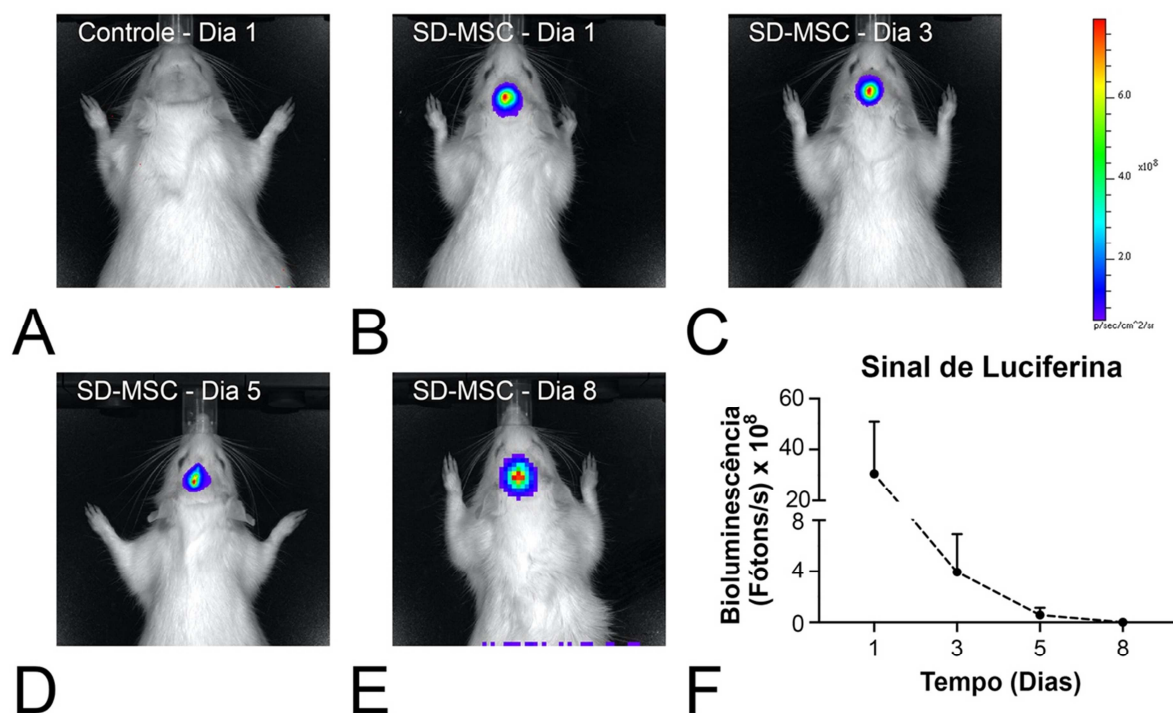


Figura 41. Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD-MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus (DM). O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=6$).

2.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

A análise das reconstruções microtomográficas 3D das calvárias de ratos com DM (Figura 42A,B) mostrou que, após 4 semanas da injeção de células, houve formação limitada de tecido ósseo, presente majoritariamente nas margens dos defeitos tratados com injeção de SD-MSC ou PBS. Além disso, não houve diferença na formação óssea nos defeitos de animais tratados com SD-MSC em comparação com os Controles (Figura 42A,B).

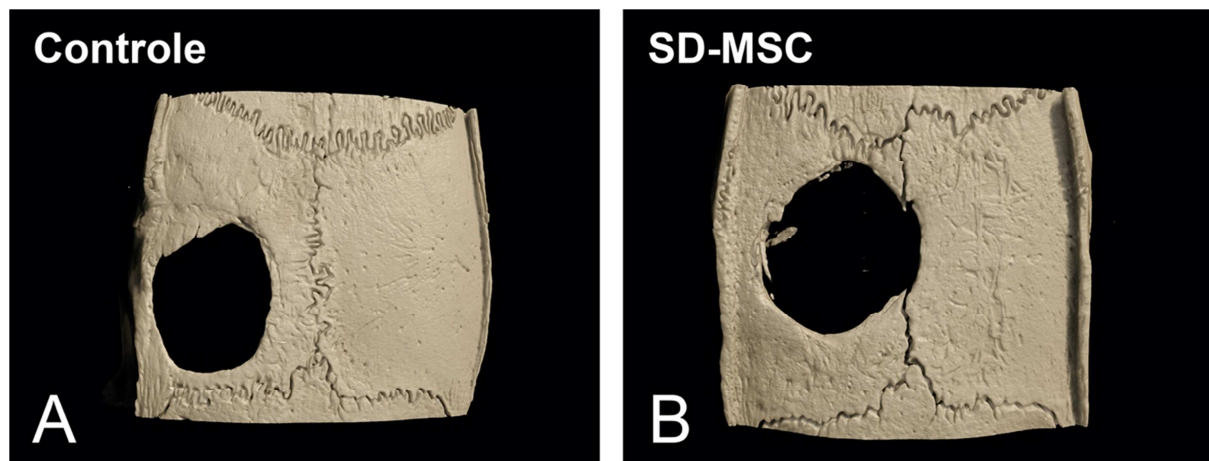


Figura 42. Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas.

As análises morfométricas das calvárias de ratos com DM (Figura 43A-F) mostraram que não houve diferença estatisticamente significante nos parâmetros BV ($p=0,180$), BV/TV ($p=0,180$), BS ($p=0,286$), Tb.Th ($p=0,446$), Tb.N ($p=0,336$) e Tb.S ($p=0,655$).

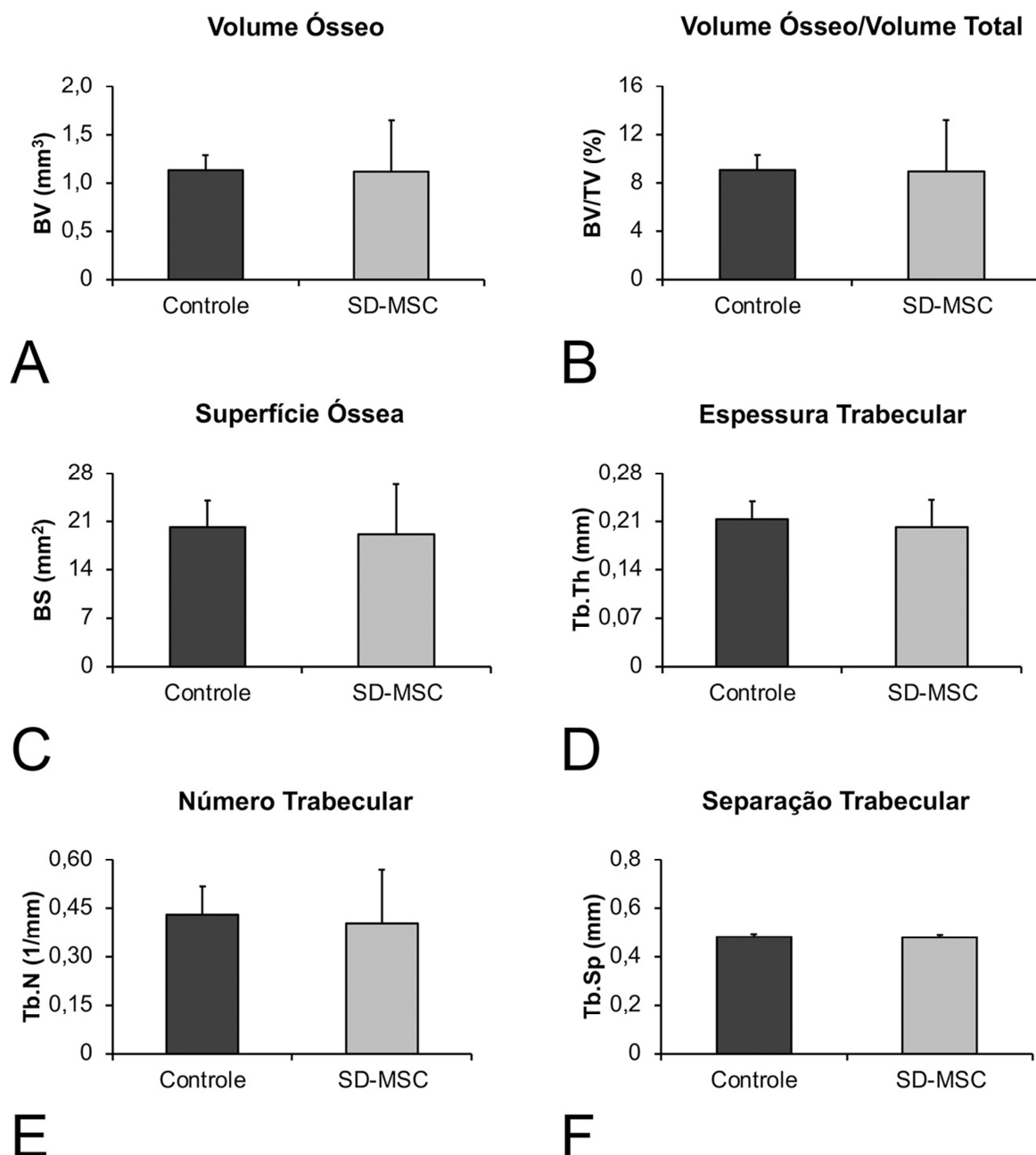


Figura 43. Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12, $p \leq 0,05$).

2.3.4.4 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

A análise histológica das calvárias de ratos com DM mostrou que não houve diferenças na quantidade de tecido ósseo formado nos defeitos tratados com injeção de SD-MSC em relação ao Controle, corroborando os dados morfométricos gerados pela análise de μ CT (Figura 44A,B). Nas margens de todos os defeitos notou-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas, osteoblastos

alinhados lado a lado na superfície óssea e osso formado (Figura 44C,D). Além disso, independente do tratamento, o osso formado apresentou características histológicas semelhantes, com tecido ósseo maduro com a presença de linha de cemento e caracterizado por lamelas dispostas paralelamente entre si, e tecido ósseo imaturo (Figura 44C-F). Não foram observados sinais inflamatórios em nenhum dos cortes histológicos.

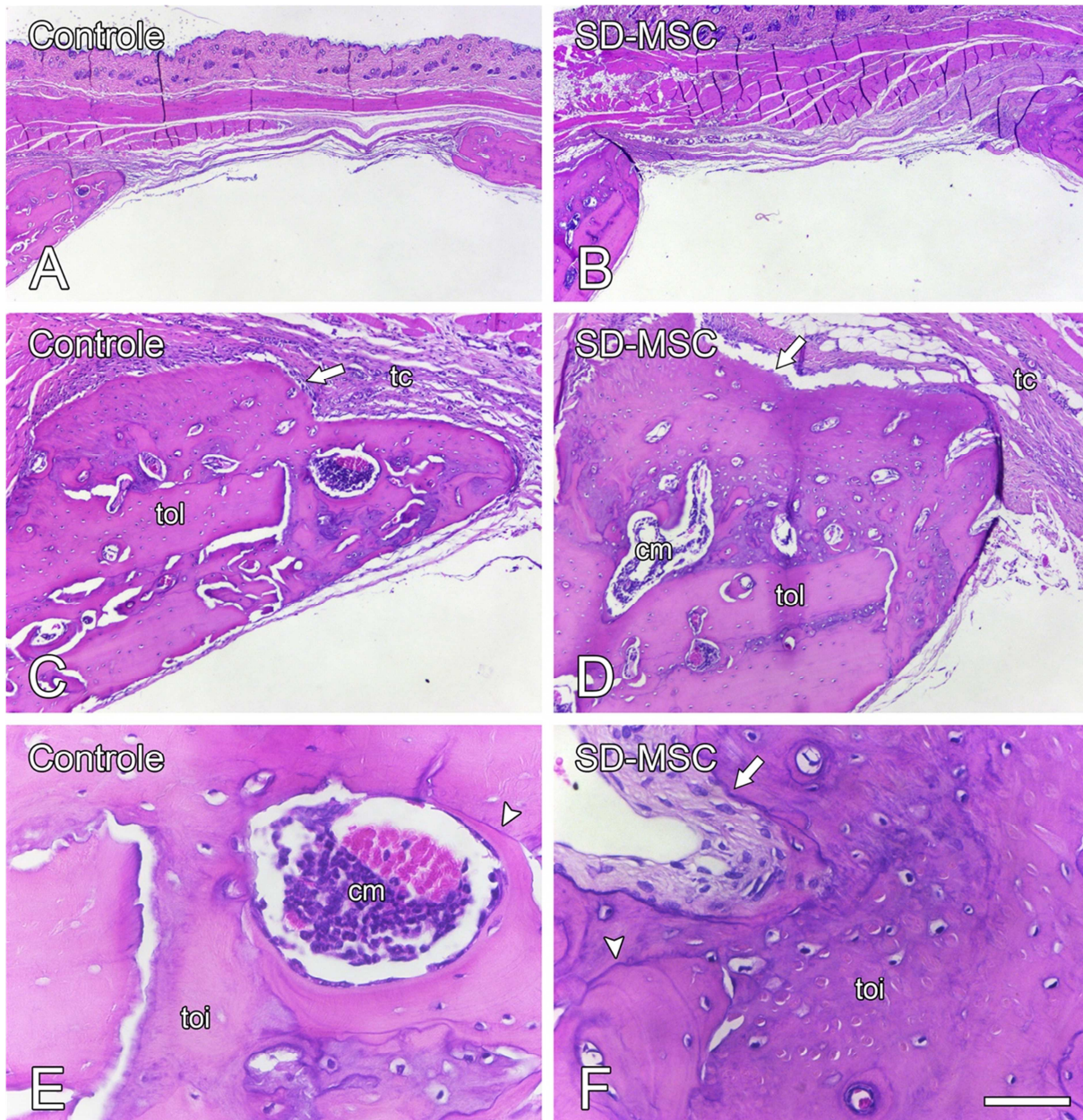


Figura 44. Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com diabetes mellitus (DM), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cemento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e Eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cemento; cm: canal medular; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar. Barra de escala: A e B = 800 μ m; C e D = 200 μ m; E e F: 50 μ m.

2.3.4.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com diabetes mellitus

Em geral, a expressão relativa dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* foi maior em tecidos colhidos de defeitos tratados com SD-MSC em comparação com o Controle ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,001$, $p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente) (Figura 45A-F).

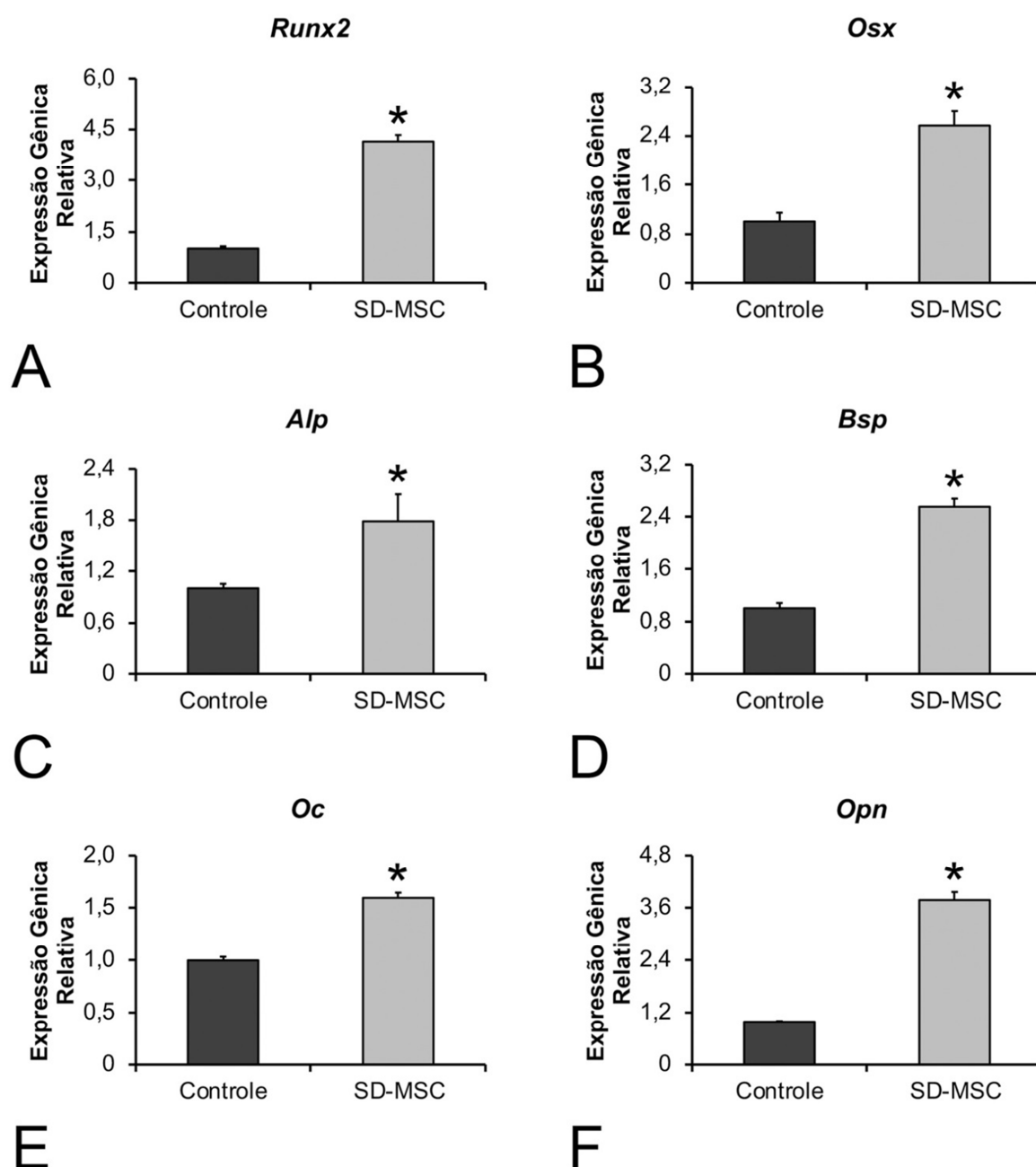


Figura 45. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com diabetes mellitus, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

2.4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da DM sobre o tecido ósseo in vivo e sobre a diferenciação osteoblástica de MSC in vitro; bem como o efeito da interação entre SD-MSC e DM-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de ambas as células em meio normo e hiperglicêmico e a eficácia da terapia celular através de injeção local de SD-MSC para regenerar defeitos ósseos de calvária de ratos acometidos pela DM.

Inicialmente, mostramos que a injeção intraperitoneal de STZ é um método eficaz para induzir a DM em ratos machos. As reconstruções 3D dos fêmures dos animais com DM e a análise dos parâmetros morfométricos gerados por μ CT mostraram que o procedimento resultou em efeitos prejudiciais ao tecido ósseo, assim como demonstrado anteriormente (SAMSULRIZAL et al., 2021; GONG et al., 2019, NI et al., 2019). De fato, a administração de STZ tem sido utilizada como modelo para estudos das alterações esqueléticas e do metabolismo ósseo causados pela DM (LIU et al., 2020; ZHANG et al., 2018; KIM et al., 2014; JOHNSON; THLIVERIS, 1989), e as evidências na literatura mostram que a hiperglicemia resulta em distúrbios do metabolismo ósseo (BAGI; EDWARDS; BERRYMAN, 2018). A DM acelera a perda óssea e ainda promove cicatrização óssea tardia, redução da espessura da placa de crescimento e aumento da porosidade cortical (MARIN et al., 2018; OSIMA et al., 2017; STALVEY et al. 2017; AJAMI et al., 2014; WONGDEE; CHAROENPHANDHU, 2011). Além disso, embora os mecanismos exatos pelos quais a DM prejudica a função de MSC endógenas ainda precisam ser elucidados, a literatura sugere que isso pode ocorrer devido, entre outras coisas, ao estresse oxidativo aumentado, disfunção mitocondrial e efeito negativo sobre a proliferação, migração e diferenciação celular (VILAHUR; NGUYEN; BADIMON, 2021; FIJANY et al., 2019; VAN DE VYVER, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que, embora as DM-MSC possuíssem capacidade de diferenciação osteoblástica, o seu potencial osteogênico foi prejudicado em comparação com NG-MSC, como visto através da atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada reduzidas, corroborando com estudos anteriores (BUENO et al., 2021; QIAN et al., 2015; STOLZING et al., 2010). Além disso, apesar de ambas as culturas não proliferarem a partir do sétimo dia, com exceção do terceiro dia o número de DM-MSC foi menor que NG-MSC nos

demais períodos de proliferação celular avaliados, semelhante ao observado anteriormente (BUENO et al., 2022; BUENO et al., 2021). Dessa forma, como as MSC contribuem para a manutenção da homeostase óssea sendo fonte de progenitores para os osteoblastos, agentes anabólicos e reguladores da osteoclastogênese (KFOURY; SCADDEN, 2018), os resultados sugerem que ao menos em parte, a perda óssea na DM pode estar relacionada à redução da capacidade de diferenciação osteoblástica de MSC, semelhante ao observado em outros estudos (GHODSI et al., 2015). Por outro lado, a baixa taxa de proliferação estaria relacionada com a redução da capacidade de autorrenovação, sugerindo que na medula óssea do modelo in vivo de DM utilizado nesse estudo, pode haver um esgotamento gradual das fontes de MSC, contribuindo para o prejuízo ao tecido ósseo provocado pela doença.

As MSC podem ser uma fonte promissora para terapia celular com vistas ao reparo de defeitos ósseos em pacientes com DM como discutido no capítulo 1. Considerando que na terapia celular as MSC podem atuar de forma parácrina (SHAO; ZHANG; YANG, 2015), nesse estudo decidiu-se avaliar in vitro o efeito de SD-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de DM-MSC e vice-versa através de cocultura indireta utilizando meio normoglicêmico ou hiperglicêmico. Este último possui concentração de glicose semelhante à observada nas amostras de sangue de animais com DM e foi utilizado com o objetivo de mimetizar em cultura o microambiente hiperglicêmico encontrado in vivo.

As SD-MSC e DM-MSC cultivadas em meio de expansão normoglicêmico ou hiperglicêmico utilizadas nesse estudo foram obtidas e cultivadas como descrito por Freitas et al. (2020) e caracterizadas como MSC por apresentarem alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem de células expressando os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 e endotelial CD31. Curiosamente, houve baixa porcentagem de células expressando CD44 e CD106, também característicos de MSC. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos e discutidos no capítulo 1.

As avaliações das interações entre SD-MSC e DM-MSC em meio osteogênico normoglicêmico mostraram que, de maneira geral, apesar de todas as culturas proliferarem ao longo do tempo, DM-MSC→DM-MSC e SD-MSC→DM-MSC apresentaram menor número de células aos 10 dias. Por outro lado, essas mesmas coculturas apresentaram maior expressão gênica dos marcadores osteoblásticos

analisados. É possível que, independente do tipo celular com que foi cultivada, o aumento na expressão gênica em DM-MSc ocorra devido a um mecanismo compensatório das células na tentativa de evitar a perda óssea causada pela DM (IWAMOTO; SEKI, 2015). No entanto, as análises do fenótipo celular confirmaram a menor diferenciação osteoblástica das DM-MSc como observado pela menor expressão proteica e atividade de ALP e menor formação de matriz mineralizada nas coculturas DM-MSc→DM-MSc. Por outro lado, a diferenciação osteoblástica foi parcialmente recuperada quando as DM-MSc foram cultivadas na presença de SD-MSc, que por sua vez não foram muito afetadas pela presença das SD-MSc.

As avaliações das interações entre SD-MSc e DM-MSc em meio osteogênico hiperglicêmico mostraram que, de maneira geral, todas as coculturas apresentaram o mesmo padrão de crescimento, mas isso não influencia a expressão gênica, na qual as coculturas DM-MSc→DM-MSc e SD-MSc→DM-MSc apresentaram menor expressão dos marcadores osteoblásticos analisados, muito provavelmente devido ao efeito negativo conjunto que a doença e a hiperglicemia têm sobre essas células (AL-QARAKHLI et al., 2019). No entanto, as análises do fenótipo celular, mostraram maior diferenciação osteoblástica das DM-MSc como observado pelas maiores atividade de ALP e formação de matriz mineralizada nas coculturas DM-MSc→DM-MSc e SD-MSc→DM-MSc.

Como discutido no capítulo 1, as vias das BMP, WNT e ITG são de fundamental importância para o processo de diferenciação osteoblástica que ocorre na interação entre essas células. A análise do PCR array das coculturas em meio osteogênico normoglicêmico realizado aos 10 dias de cultura mostrou que as interações estudadas afetam as vias de sinalização das BMP, WNT e ITG de maneira complexa e que precisam ser melhores e mais detalhadamente estudadas para o melhor entendimento de como a DM afeta essas vias. Em geral, vários genes das três vias e nas três coculturas foram regulados positivamente e a complexidade das interações estudadas corroboram com os resultados obtidos nas avaliações fenotípicas ao mostrar que a diferenciação osteoblástica de DM-MSc→DM-MSc foi a mais prejudicada talvez pelo fato de nestas haver maior número de genes das três vias regulados negativamente, em comparação com as demais coculturas, enquanto para as SD-MSc→DM-MSc ela foi recuperada parcialmente e DM-MSc→SD-MSc não foi afetada, como visto na formação de matriz extracelular mineralizada. Esses resultados sugerem, ao menos em parte, que os efeitos positivos de SD-MSc na

diferenciação osteoblástica de DM-MSc se deve à modulação positiva da maioria dos genes das vias das BMP, WNT e ITG, enquanto DM-MSc exerce pouco ou nenhum efeito sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSc. Por outro lado, não se pode descartar os eventuais efeitos positivos à diferenciação osteoblástica exercidos pela realização das culturas de DM-MSc em meio normoglicêmico, o que o desenho experimental desse estudo não permitiu avaliar.

A análise do PCR array das coculturas em meio osteogênico hiperglicêmico corroborou com os resultados obtidos nas avaliações fenotípicas. De maneira geral, a grande maioria dos genes das três vias, foram regulados positivamente nas coculturas que tiveram maior diferenciação osteoblástica, como visto na formação de matriz extracelular mineralizada em DM-MSc→DM-MSc e SD-MSc→DM-MSc. O mais provável é que as SD-MSc ao serem submetidas à hiperglicemia tenham sofrido maior influência desse microambiente, que promove diminuição da formação de colônias, perda do potencial osteogênico, aumento do estresse oxidativo e produtos finais de glicação avançada, juntamente com deposição de matriz extracelular alterada e mineralização reduzida (CUNHA et al., 2014; ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2010). Corroborando com isso, observa-se que o perfil de expressão gênica das três vias nos heatmaps revela poucos genes diferencialmente modulados entre as culturas SD-MSc→SD-MSc e DM-MSc→SD-MSc.

A partir das análise de PCR array tanto em meio normoglicêmico quanto hiperglicêmico, não se descarta que outras vias de sinalização, não avaliadas nesse estudo, possam estar envolvidas na diferenciação osteoblástica, além de se considerar ainda a complexidade desse processo, onde muitos genes das vias avaliadas participam de funções biológicas diversas, tais como proliferação, diferenciação e migração celular, desenvolvimento embrionário e esquelético, formação óssea, remodelação e reparo tecidual, defesa do hospedeiro e homeostasia. (YAN et al., 2022; YU et al., 2021; COSTANTINI et al., 2018; PERSSON et al., 2019; HENDRICKX et al., 2017; DOCHEVA et al., 2014; LIU et al., 2013; MULLIN et al., 2013; KATOH; KATOH, 2007).

A ausência de correlação entre os achados genotípicos de PCR em tempo real e fenotípicos encontrada neste estudo pode ser explicada, ao menos em parte, por mecanismos epigenéticos pós-transcricionais discutidos no capítulo 1. De fato, recentemente foi mostrado a participação dos microRNAs miR-203a e miR-31-5p no desenvolvimento da DM (HEILMEIER et al., 2022, GUAN; ZHOU; LI, 2011).

Embora neste estudo não se tenha feito qualquer avaliação para determinar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados de SD-MSC sobre DM-MSC e vice-versa, considerando que os resultados foram obtidos por meio de experimentos de cocultura, é certo que, ao menos em meio normoglicêmico, ocorreram devido ao efeito parácrino, como discutido no capítulo 1.

A terapia celular tem atraído considerável atenção da comunidade científica para o tratamento de diversas condições clínicas em pacientes com DM, ou para tratar a doença em si (CHEN; DU; ZOU, 2020; LOPES et al., 2018; LIEW; O'BRIEN, 2014). À semelhança do discutido no capítulo 1, nesse estudo foram utilizadas MSC alógenas jovens e saudáveis como estratégia para reparar defeitos ósseos de ratos com DM.

Em relação à reação devido o uso clínico de SD-MSC alógenas em terapia celular, confirmando os resultados descritos no capítulo 1, houve baixa porcentagem de SD-MSC expressando ambos MHC classes I e II, permitindo assim que fossem utilizadas com riscos mínimos para os ratos em que foram injetadas.

Na terapia celular, observamos que a permanência das células nos defeitos ósseos foi afetada pela doença. Após injeção, as células permaneceram na região dos defeitos ósseos criados na calvária dos ratos com DM por um período de até 8 dias, diferentemente de estudos anteriores, os quais, utilizando ratos saudáveis observaram que as células permaneceram na região dos defeitos por até 14 dias (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Ao menos em parte, esses resultados diferentes podem ser explicados pelo fato que o ambiente doente nos defeitos de ratos com DM pode ser mais hostil às células, e além da doença, esses animais eram mais velhos comparados aos animais dos estudos citados anteriormente (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Além disso, estudos relatam que uma vida útil curta das células injetadas também pode ser resultado do estresse físico da injeção, inflamação local, desnutrição e hipóxia (ROSENSTRAUCH et al., 2005; SORTWELL; PITZER; COLLIER, 2000). Embora os outros fatores não tenham sido avaliados pelo nosso grupo de estudo, certamente o estresse físico da injeção não é um fator relevante porque o método utilizado para injetar as MSC não interfere com sua viabilidade (FREITAS et al., 2019a).

A respeito da formação óssea obtida nos defeitos desses animais, as reconstruções 3D e os parâmetros morfométricos gerados por μ CT não mostraram diferenças em termos de formação óssea nos defeitos tratados com injeção local de

SD-MSC comparados ao Controle. A normalização do parâmetro BV/TV do tratamento com SD-MSC pelo com PBS, como preconizado por Freitas et al. (2021), é de 0,99, indicando que a formação óssea pelas SD-MSC semelhante à induzida por PBS. Esses resultados estão de acordo com a análise histológica que mostrou tecido conjuntivo e a presença de fibras colágenas desorganizadas em ambos os grupos. Como já havíamos demonstrado em outros estudos que a terapia celular foi eficaz (ADOLPHO et al., 2022; SOUZA et al., 2020; FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b; SOUZA et al., 2018; FREITAS et al., 2017) mesmo na presença da osteoporose (Capítulo 1) sugere-se que na presença de DM as MSC sejam injetadas em microambiente que prejudica seu potencial para induzir a formação óssea. Baseado nos efeitos observados na interação entre SD-MSC e DM- MSC em ambiente hiperglicêmico, similar ao encontrado in vivo, as MSC injetadas teriam pouco efeito sobre as MSC residentes nos defeitos ósseos. É possível especular que, se a hiperglicemia estivesse controlada nos ratos DM, talvez a terapia celular tivesse mostrado alguma eficácia.

Alguns aspectos moleculares do osso formado através de injeção local de SD-MSC também foram investigados pela expressão gênica de alguns marcadores osteoblásticos, que traduzem proteínas características de formação óssea. A despeito de não ter ocorrido maior formação, todos os genes avaliados foram mais expressos no tecido ósseo induzido pelas MSC.

Nesse estudo, nós demonstramos que SD-MSC recuperam parcialmente o potencial osteogênico de DM- MSC em condições normoglicêmicas, mas não em condições hiperglicêmicas, a qual prejudica o potencial osteogênico de SD- MSC. Além disso, a terapia celular baseada em injeções locais de SD- MSC não foi efetiva em induzir formação óssea significativa na presença de DM, muito provavelmente pela falta do controle da glicemia dos animais.

2.5 CONCLUSÕES

- A administração de STZ é eficaz em induzir a DM em ratos, a qual prejudica o tecido ósseo e diferenciação osteoblástica de MSC.
- Em meio osteogênico normoglicêmico, a diferenciação osteoblástica de DM- MSC é recuperada parcialmente quando essas células são cultivadas com SD- MSC, enquanto a diferenciação osteoblástica destas últimas é pouco afetada quando

essas células são cultivadas com DM-MSc. Em meio osteogênico hiperglicêmico, a diferenciação osteoblástica de DM-MSc não é afetada quando essas células são cultivadas com SD-MSc, enquanto a diferenciação osteoblástica destas últimas é prejudicada independentemente do tipo celular com a qual são cultivadas.

- A injeção local de SD-MSc não foi eficaz em induzir formação óssea comparada à injeção de PBS.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3 – EFEITOS DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS SAUDÁVEIS E COM HIPERTENSÃO ARTERIAL NA DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica E NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar in vivo o efeito da HA sobre o tecido ósseo.
- Avaliar in vitro o efeito da HA sobre a diferenciação osteoblástica de MSC.
- Avaliar in vitro a influência de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos saudáveis jovens (SD-MSc) sobre a diferenciação osteoblástica de MSC isoladas a partir da medula óssea de ratos com HA (HA-MSc), e destas sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSc, crescidas em condições osteogênicas, utilizando um modelo de cocultura indireta.
- Avaliar in vivo o efeito de injeção local de SD-MSc para regenerar o tecido ósseo de ratos com HA, utilizando um modelo de defeito ósseo criado em calvária.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Para os experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar e ratos espontaneamente hipertensos da linhagem Wistar Kyoto (SHR, do Inglês spontaneously hypertensive rats) com aproximadamente 150-200 g e 4 semanas de vida. O número e a distribuição de animais seguiram a descrição abaixo:

- 52 ratos SHR, dos quais: 6 animais foram utilizados para confirmar o efeito da HA no tecido ósseo (grupo HA); 14 animais foram utilizados para obtenção e cultura de HA-MSc; e 32 animais foram utilizados para os experimentos in vivo.
- 47 ratos Wistar normotensos (NT), dos quais: 6 foram utilizados como Controle para confirmar o efeito da HA no tecido ósseo (grupo NT), 6 foram utilizados para obtenção e cultura de MSC isoladas a partir da medula óssea (NT-MSc), 15 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSc utilizadas nos experimentos de cocultura indireta e 20 foram utilizados para obtenção e cultura de SD-MSc para injeção local nos defeitos ósseos criados nos ratos com HA.

3.2.2 Desenvolvimento da hipertensão arterial

Ratos SHR foram mantidos no biotério por até 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida, período em que a HA já está estabelecida e as MSC estão afetadas pela doença (MANRIQUE et al., 2015; CURSINO, 2014; DICKHOUT; LEE, 1998). Esse modelo experimental, sem necessidade de nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico foi desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963). Ratos saudáveis da linhagem Wistar foram mantidos nas condições e períodos descritos para os ratos SHR para serem utilizados como NT. Previamente à eutanásia dos animais, a verificação da HA foi realizada através da mensuração da pressão arterial sistólica utilizando o aparelho Paver Lab 4/26 acoplado a um sistema ML125 NIBP Controller (ADInstruments, Nova Zelândia), segundo as instruções do fabricante. Foram considerados com HA os ratos que apresentaram pressão arterial sistólica igual ou superior a 150 mmHg, sendo que, para a espécie, são considerados NT aqueles com pressão arterial sistólica variando entre 120 e 140 mmHg (DORIS, 2017; LOUIS; HOWES, 1990; SIMPSON, 1974; OKAMOTO; AOKI, 1963). Durante os 90 dias, os animais foram mantidos em número de 3 por caixa no biotério até o início dos experimentos. Durante esse período, os animais receberam ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.2.2.1 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo dos fêmures de ratos com hipertensão arterial e normotensos

Ao final de 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida dos animais, foram realizados os procedimentos de eutanásia dos animais NT e HA, remoção e fixação dos fêmures, escaneamento em microtomógrafo e obtenção dos parâmetros morfométricos, como descrito no capítulo 1, item 1.2.2.1.

3.2.3 Efeito da hipertensão arterial sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

3.2.3.1 Obtenção e cultura de NT-MSc e HA-MSc

Para avaliar o efeito da HA sobre a diferenciação osteoblástica de MSC, NT-MSc e HA-MSc foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos NT e com HA, respectivamente. A eutanásia dos animais foi realizada como descrito no capítulo 1,

item 1.2.2.1 e os procedimentos de remoção e transporte dos fêmures, obtenção e cultura de células foram realizados como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.1. O cultivo foi realizado durante 7 dias para permitir a seleção de MSC por aderência ao poliestireno e obtenção de células em número suficiente para a realização dos experimentos. Durante esse período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

3.2.3.2 Diferenciação osteoblástica de NT-MSC e HA-MSC

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e as células aderidas foram desprendidas e obtida suspensão de células como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2. Em seguida, NT-MSC e HA-MSC foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços contendo meio de expansão na densidade de 10⁴ células/poço. Após 2 dias, tempo necessário para aderência celular, o meio de expansão foi substituído por meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica. As respostas celulares avaliadas foram: proliferação celular, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada. As células foram mantidas e o meio de cultura foi trocado nas mesmas condições como descrito no item 3.2.3.1.

3.2.3.2.1 Proliferação de NT-MSC e HA-MSC

A proliferação de NT-MSC e HA-MSC foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cultura pelo ensaio colorimétrico MTT seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.1.

3.2.3.2.2 Atividade de ALP em NT-MSC e HA-MSC

A atividade de ALP em NT-MSC e HA-MSC foi determinada ao final de 7 e 10 dias de cultura seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.2.

3.2.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSC e HA-MSC

A formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSC e HA-MSC foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) e quantificada aos 17 dias de cultura, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.3.

3.2.4 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de HA-MSC e de HA-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC

3.2.4.1 Obtenção e cultura de SD-MSC e HA-MSC

SD-MSC e HA-MSC foram isoladas da medula óssea de fêmures de ratos saudáveis jovens e com HA, respectivamente, sendo os saudáveis jovens com aproximadamente 4 semanas de vida e 150-200 g. As células foram obtidas e cultivadas como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.1. Em seguida, foram caracterizadas como MSC por citometria de fluxo e utilizadas nos experimentos de cocultura. SD-MSC foram também utilizadas nos experimentos para avaliar o reparo de defeitos de calvária de ratos com HA.

3.2.4.1.1 Caracterização de HA-MSC por citometria de fluxo

A caracterização por citometria de fluxo de HA-MSC foi realizada utilizando os mesmos anticorpos e protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.1.1.

3.2.4.2 Cocultura indireta de SD-MSC e HA-MSC e diferenciação osteoblástica

Após 7 dias, quando as culturas atingiram subconfluência, o meio de expansão foi removido e obtida suspensão de células, como descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2. As células foram cultivadas em modelo de cocultura indireta utilizando insertos com filtros porosos de 0,4 μm (Transwell, Corning Incorporated). Inicialmente, SD-MSC e HA-MSC foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços ou insertos contendo meio de expansão com densidades de plaqueamento de 10^4 células, de forma que os tipos celulares foram cultivados tanto nos insertos como separadamente no fundo dos poços. Para permitir sua aderência, as células foram mantidas separadas durante 2 dias. Após esse período, foi realizada a cocultura indireta substituindo o meio de expansão por meio osteogênico para induzir a diferenciação osteoblástica. Os controles foram SD-MSC e HA-MSC cocultivadas em meio osteogênico tanto no inserto quanto no poço, de forma que as coculturas formadas foram SD-MSC \rightarrow SD-MSC, HA-MSC \rightarrow HA-MSC, SD-MSC \rightarrow HA-MSC e HA-MSC \rightarrow SD-MSC (Figura 46). Para avaliação das respostas celulares os insertos foram descartados e as células dos poços foram submetidas às seguintes avaliações: proliferação celular, expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real, expressão proteica de marcadores osteoblásticos por western blot, atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada.

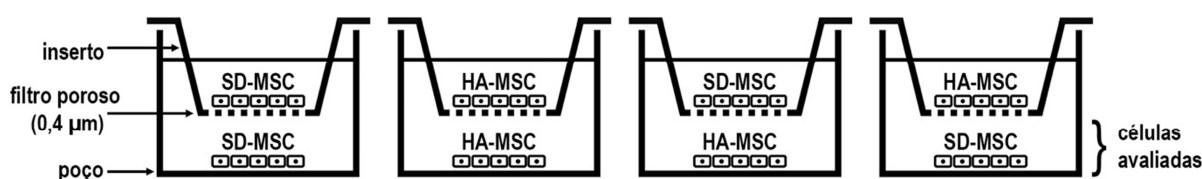


Figura 46. Imagem ilustrativa da cocultura indireta de SD-MSC e HA-MSC cultivadas nos insertos e poços de placas de poliestireno em meio osteogênico. As avaliações foram realizadas nas células cultivadas nos poços sob influência das células cultivadas nos insertos.

3.2.4.3 Proliferação de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A proliferação de SD-MSC e HA-MSC foi determinada aos 3, 7 e 10 dias de cocultura indireta pelo ensaio colorimétrico MTT seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.1.

3.2.4.4 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A expressão gênica de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc*, *Opn* e *Ctnnb1* em SD-MSC e HA-MSC foi avaliada aos 7 e 10 dias de cocultura indireta por PCR em tempo real seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.4.

3.2.4.5 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A detecção da expressão proteica em SD-MSC e HA-MSC foi realizada por western blot aos 10 dias de cocultura indireta seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.5.

3.2.4.6 Atividade de ALP em SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A atividade de ALP em SD-MSC e HA-MSC foi avaliada ao final de 7 e 10 dias de cocultura indireta, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.2.

3.2.4.7 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e HA-MSC foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) e quantificada aos 17 dias de cocultura indireta, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.3.2.3.

3.2.4.8 *Investigação da modulação de genes das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta*

Ao final de 10 dias de cocultura indireta, a análise do perfil de expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de BMPs, WNT e ITG durante o processo de diferenciação osteoblástica foi realizado através da técnica PCR array seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.5.

3.2.5 *Avaliação do efeito de injeção local de SD-MSC na formação óssea de defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial*

3.2.5.1 *Obtenção e cultura de SD-MSC*

SD-MSC foram obtidas e cultivadas seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.4.1.

3.2.5.1.1 *Avaliação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC classes I e II) em SD-MSC*

A avaliação da expressão das moléculas do MHC em SD-MSC foi realizada por citometria de fluxo, seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.5.1.1.

3.2.5.2 *Procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos*

Os ratos com HA foram submetidos à cirurgia para criação de defeitos ósseos nas calvárias, 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida dos animais, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.2. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram medicados como descrito no capítulo 1, item 1.2.2, e transferidos ao biotério, onde foram mantidos em número de 3 por caixa, recebendo ração e água sem restrições ou limite e ficaram sob monitoramento constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.2.5.3 *Injeção local de SD-MSC nos defeitos ósseos*

Após 2 semanas da criação dos defeitos ósseos, os animais foram submetidos a nova intervenção para a injeção de SD-MSC ou PBS seguindo o mesmo protocolo experimental descrito no capítulo 1, item 1.2.5.3.

3.2.5.4 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

A avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos foi realizado como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.4.

3.2.5.5 Avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária de ratos com hipertensão arterial

Os ratos com HA foram divididos em 2 grupos: SD-MSC tratados com injeção de células e Controle, com injeção de PBS, para avaliação da formação óssea induzida por SD-MSC em defeitos de calvária, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.5.

Decorridas 4 semanas da injeção, foram realizadas a eutanásia, remoção e fixação das calvárias como descrito no capítulo 1, itens 1.2.2.1 e 1.2.5.5, para avaliação do tecido ósseo formado por μ CT, seguida de processamento para análise histológica, ou para avaliação de marcadores osteoblásticos no tecido formado por PCR em tempo real.

3.2.5.6 Análise microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

Para avaliar o tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com HA após injeção de PBS ou SD-MSC, as calvárias foram submetidas ao escaneamento em microtomógrafo como descrito no capítulo 1, item 1.2.2.1, e obtenção dos parâmetros morfométricos, como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.6.

3.2.5.7 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

Após o escaneamento por μ CT, as amostras foram processadas para histologia como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.7.

3.2.5.8 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

A avaliação da expressão dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* por PCR em tempo real no tecido ósseo formado em defeitos criados

na calvária de ratos com HA após injeção de PBS ou SD-MSC foi realizada como descrito no capítulo 1, item 1.2.5.8.

3.2.6 *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas como descrito no capítulo 1, item 1.2.6.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 *Efeito da hipertensão arterial no tecido ósseo*

Após 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida dos animais, os valores obtidos através da avaliação da pressão arterial sistólica confirmaram que os ratos SHR desenvolveram HA, enquanto para os ratos da linhagem Wistar os valores se mantiveram normais, sendo considerados como NT (Figura 47).

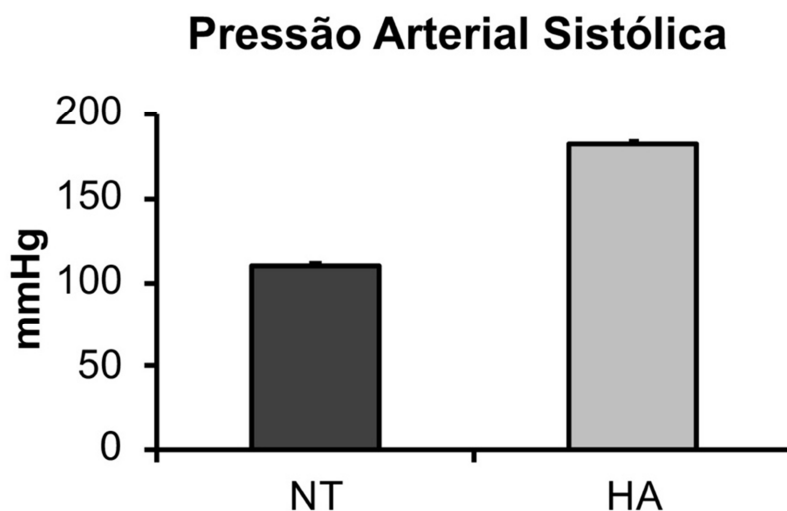


Figura 47. Medidas da pressão arterial sistólica de ratos Wistar (NT) e SHR (HA). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=12).

A análise das reconstruções microtomográficas 3D mostrou, após 90 dias contados a partir da 4ª semana de vida dos animais, diferenças qualitativas na estrutura óssea da porção distal dos fêmures entre os ratos NT e HA. Nos NT notou-se maior densidade de trabéculas (Figura 48A,B), quando comparados com os HA, nos quais houve redução da densidade trabecular (Figura 48C,D).

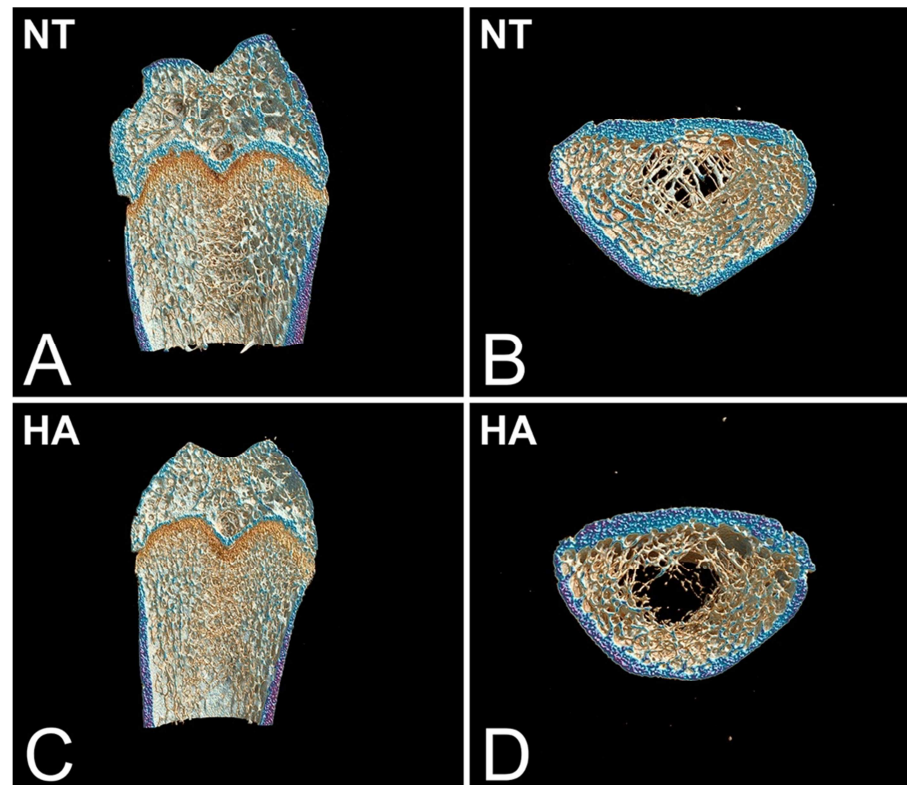


Figura 48. Reconstruções microtomográficas tridimensionais de fêmures de ratos normotensos (NT; A e B) e com hipertensão arterial (HA; C e D), após 90 dias contados a partir da 4^a semana de vida.

As análises morfométricas (Figura 49A-H) mostraram que os parâmetros BV ($p=0,002$), BV/TV ($p=0,001$), BS ($p=0,002$), Tb.Th ($p=0,002$), Tb.N ($p=0,010$) e BMD ($p=0,004$) dos ratos HA foram menores comparados com os NT, enquanto na Tb.Sp ($p=0,132$) e Conn.D ($p=0,106$) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

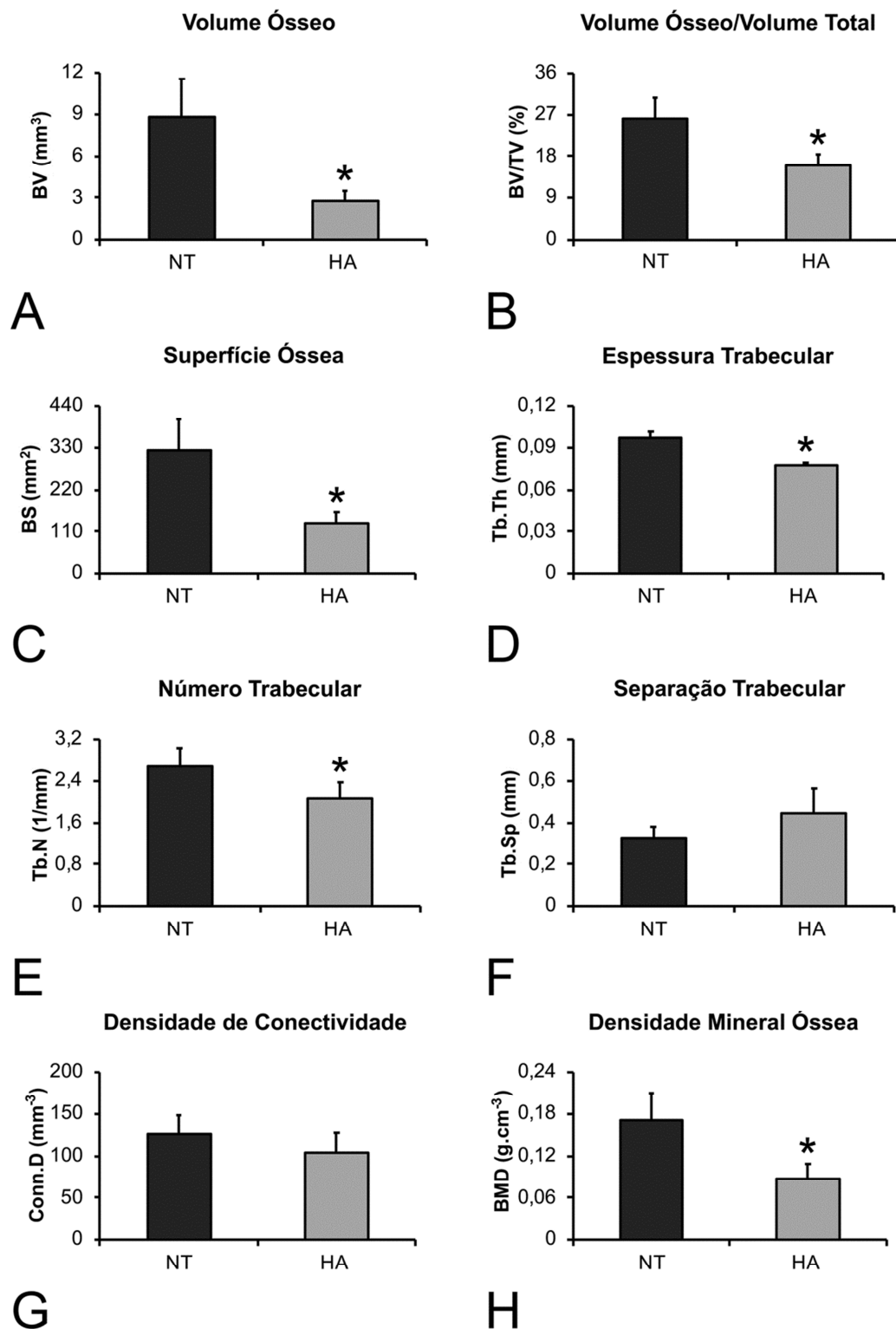


Figura 49. Parâmetros morfométricos de fêmures de ratos normotensos (NT) ou ratos com hipertensão arterial (HA), após 90 dias contados a partir da 4^a semana de vida dos animais. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=6$).

3.3.2 Efeito da hipertensão arterial sobre a diferenciação osteoblástica de MSC

3.3.2.1 Proliferação de NT-MSC e HA-MSC

Os resultados de proliferação de NT-MSC e HA-MSC (Figura 50A) mostraram que as culturas apresentaram comportamento diferente entre si. As NT-MSC proliferaram de 3 para 7 dias ($p=0,001$), mas não entre 7 e 10 dias ($p=0,547$). As HA-MSC não proliferaram ao longo dos períodos avaliados ($p=0,213$, $p=0,448$ e $p=0,869$, respectivamente). Em todos os períodos avaliados, NT-MSC apresentaram maior número de células que HA-MSC ($p=0,001$, para todos os períodos).

3.3.2.2 Atividade de ALP em NT-MSC e HA-MSC

Os resultados da atividade de ALP em NT-MSC e HA-MSC (Figura 50B) mostraram que, independentemente dos tipos de culturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,018$). Aos 7 e 10 dias de cultura houve maior atividade ALP em NT-MSC comparadas às HA-MSC ($p=0,001$, para ambos).

3.3.2.3 Formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSC e HA-MSC

Os resultados da formação de matriz extracelular mineralizada por NT-MSC e HA-MSC (Figura 50C) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi maior em NT-MSC comparadas às HA-MSC ($p=0,001$).

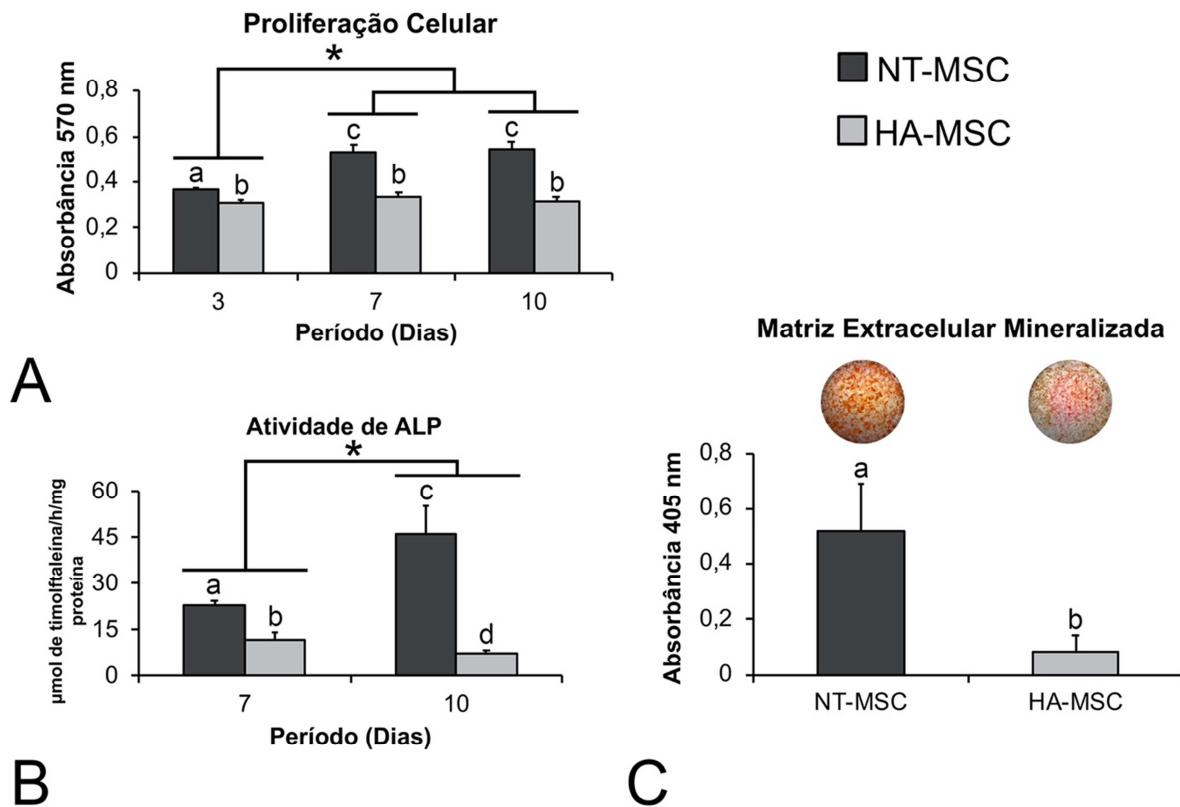


Figura 50. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias (A), atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 10 dias (B) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (C) em culturas de NT-MSC e HA-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n=5; $p \leq 0,05$).

3.3.3 Efeito de SD-MSC na diferenciação osteoblástica de HA-MSC e de HA-MSC na diferenciação osteoblástica de SD-MSC

3.3.3.1 Caracterização de HA-MSC por citometria de fluxo

Após 7 dias de cultura em meio de expansão, o perfil de expressão dos marcadores de superfície confirmou que as culturas de HA-MSC apresentaram características de MSC. As culturas apresentaram alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90, aproximadamente metade delas expressaram CD45 e baixas porcentagens expressaram CD31, CD34, CD44 e CD106 (Figura 51A-G),

As SD-MSC utilizadas nas coculturas indiretas descritas nesse capítulo foram caracterizadas previamente por citometria de fluxo e os resultados estão descritos no Capítulo 1, item 1.3.3.1.

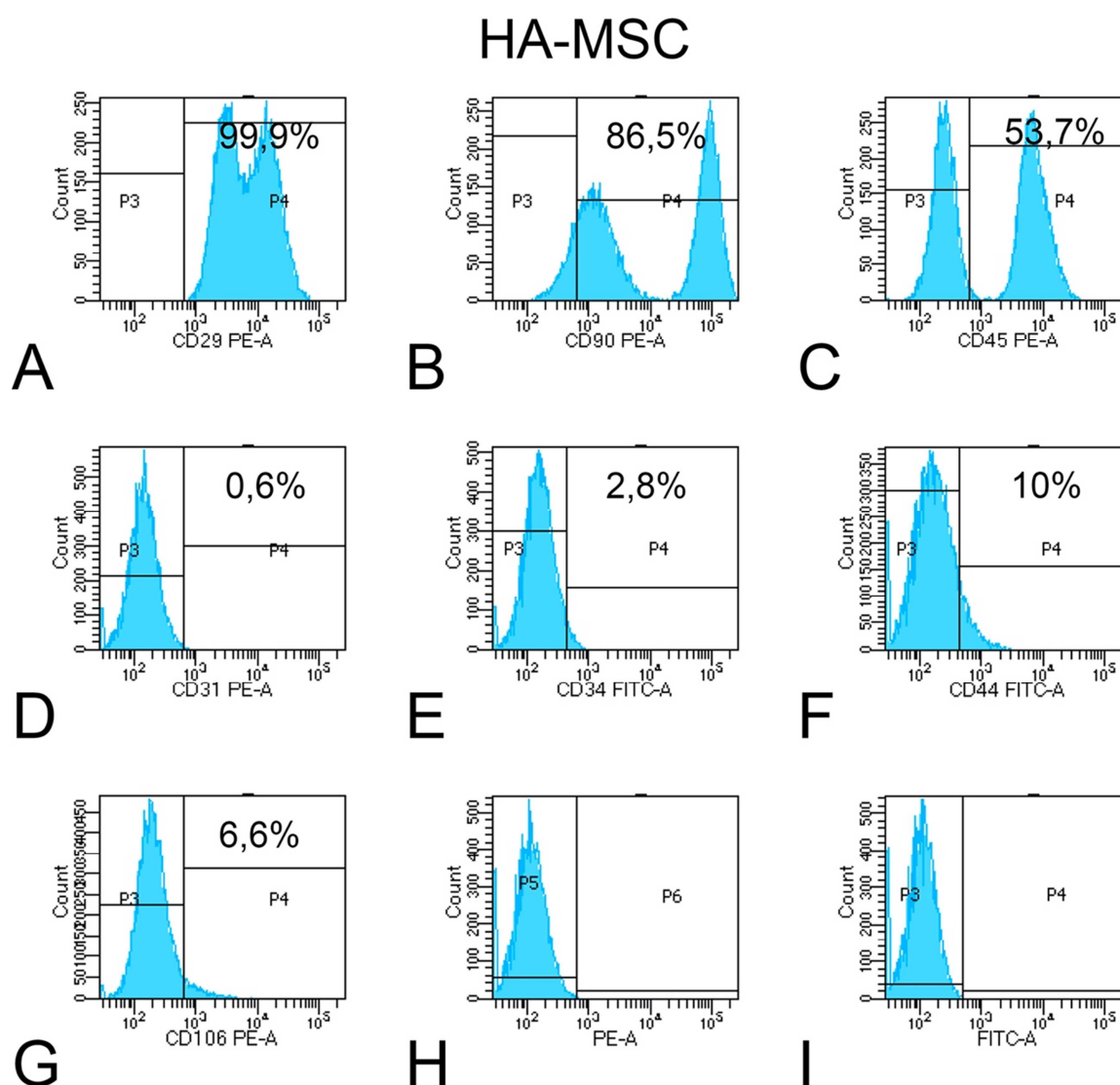


Figura 51. Histogramas e porcentagem de HA-MSC expressando os marcadores de superfície CD29 (A), CD90 (B), CD45 (C), CD31 (D), CD34 (E), CD44 (F) e CD106 (G), assim como células não incubadas com os anticorpos (H-I).

3.3.3.2 Proliferação de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

Os resultados da proliferação (Figura 52) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliados, houve proliferação celular porque foi observado aumento do número de células de 3 para 7 dias e de 7 para 10 dias ($p=0,001$, para ambos os intervalos). Aos 3 e 7 dias de cocultura, havia maior número de células em HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,710$ e $p=0,133$, respectivamente), mas em ambas a quantidade de células foi maior do que em SD-MSC→SD-MSC e HA-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,999$ e $p=0,981$, respectivamente). Aos 10 dias havia maior número de células em SD-

MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,716$), mas em ambas a quantidade de células foi maior do que em SD-MSC→SD-MSC e HA-MSC→HA-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,077$).

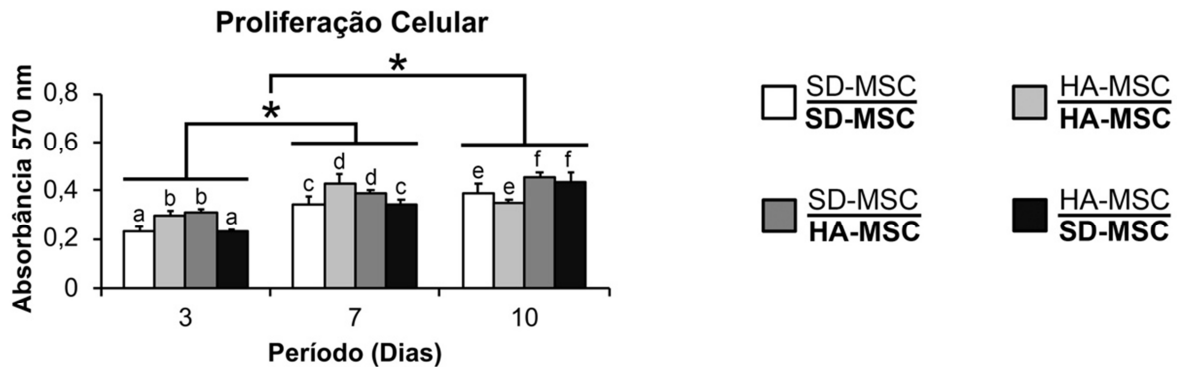


Figura 52. Proliferação celular aos 3, 7 e 10 dias de coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=5$; $p\leq 0,05$).

3.3.3.3 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A expressão relativa do gene *Runx2* (Figura 53A) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→HA-MSC ($p=0,003$), mas não maior que HA-MSC→HA-MSC ($p=0,199$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,258$). No mesmo período, a expressão relativa de *Runx2* foi menor em SD-MSC→SD-MSC quando comparada a HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para todas). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Runx2* foi maior em HA-MSC→HA-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,040$) e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,033$), mas não maior que HA-MSC→SD-MSC ($p=0,591$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa.

A expressão relativa do gene *Osx* (Figura 53B) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Osx* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-

MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,526$). Aos 10 dias a expressão relativa de *Osx* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,950$), mas em ambas foi maior do que HA-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,422$).

A expressão relativa do gene *Alp* (Figura 53C) não foi diferente nos dois períodos avaliados, independente dos tipos de coculturas ($p=0,166$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Alp* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,630$). Aos 10 dias a expressão relativa de *Alp* não foi diferente entre SD-MSC→SD-MSC e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,097$), mas em ambas foi maior do que HA-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambas) e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,638$).

A expressão relativa do gene *Bsp* (Figura 53D) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,038$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Bsp* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,944$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Bsp* também foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,800$).

A expressão relativa do gene *Oc* (Figura 53E) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Oc* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para todas), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa. Aos 10 dias, a expressão

relativa de *Oc* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,951$).

A expressão relativa do gene *Opn* (Figura 53F) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 7 dias do que aos 10 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Opn* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$), que foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC ($p=0,001$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Opn* foi maior em HA-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,062$).

A expressão relativa do gene *Ctnnb1* (Figura 53G) foi diferente nos dois períodos avaliados, de tal forma que, independente dos tipos de coculturas, houve maior expressão aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em SD-MSC→SD-MSC quando comparada a HA-MSC→SD-MSC ($p=0,001$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$, para ambos), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,970$). Aos 10 dias, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi maior em SD-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→HA-MSC ($p=0,001$) e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,007$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,583$). No mesmo período, a expressão relativa de *Ctnnb1* foi menor em HA-MSC→HA-MSC quando comparada SD-MSC→SD-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,001$, para todas).

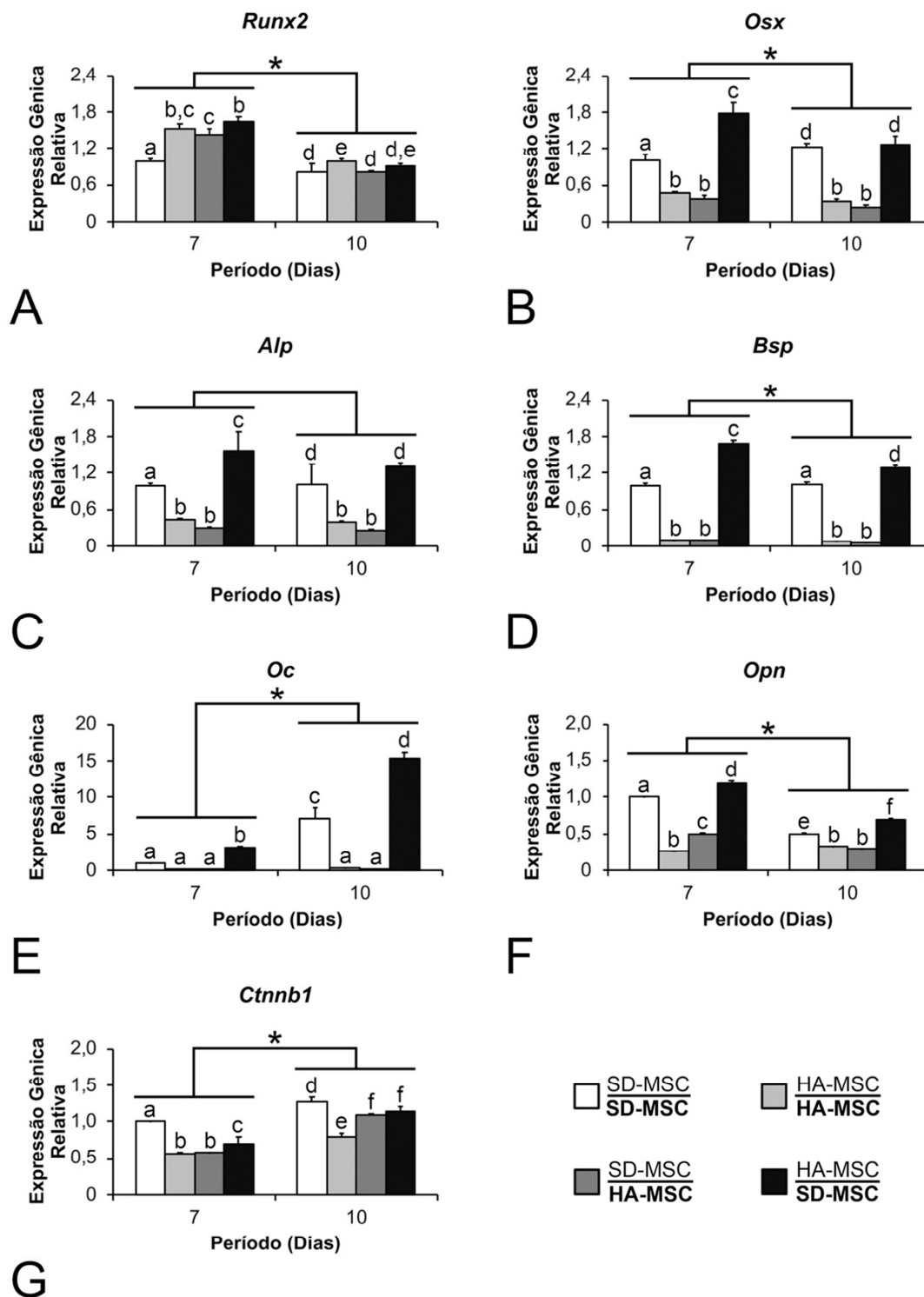


Figura 53. Expressão gênica relativa de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Opn* (F) e *Ctnnb1* (G) aos 7 e 10 dias, em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4; p≤0,05).

3.3.3.4 Avaliação da expressão proteica por western blot de SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

A expressão relativa da proteína ALP (Figura 54A) foi menor em SD-MSC→OSD-MSC quando comparada a SD-MSC→HA-MSC ($p=0,007$), que foi maior comparada a HA-MSC→HA-MSC ($p=0,009$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→SD-MSC ($p=0,004$).

A expressão relativa da proteína OPN (Figura 54B) foi maior em SD-MSC→SD-MSC quando comparada a SD-MSC→HA-MSC ($p=0,003$), que por sua vez foi maior quando comparada a HA-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,006$ e $p=0,003$, respectivamente), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,941$).

3.3.3.5 Atividade de ALP em SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

Os resultados da atividade de ALP (Figura 54C) mostraram que, independente dos tipos de coculturas avaliadas, houve maior atividade enzimática aos 10 dias do que aos 7 dias ($p=0,001$). Aos 7 dias de cocultura, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre as coculturas. No entanto, aos 10 dias, houve maior atividade de ALP em SD-MSC→SD-MSC e HA-MSC→SD-MSC, dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$). No mesmo período, a atividade de ALP foi maior em SD-MSC→HA-MSC quando comparada a HA-MSC→HA-MSC ($p=0,001$).

3.3.3.6 Formação de matriz extracelular mineralizada por SD-MSC e HA-MSC em cocultura indireta

Os resultados de formação de matriz extracelular mineralizada (Figura 54D) mostraram que todas as culturas apresentaram mineralização da matriz, que foi menor em HA-MSC→HA-MSC quando comparada às outras coculturas. Houve maior mineralização em SD-MSC→SD-MSC do que em SD-MSC→HA-MSC ($p=0,002$) e HA-MSC→SD-MSC ($p=0,006$), dentre as quais não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,920$).

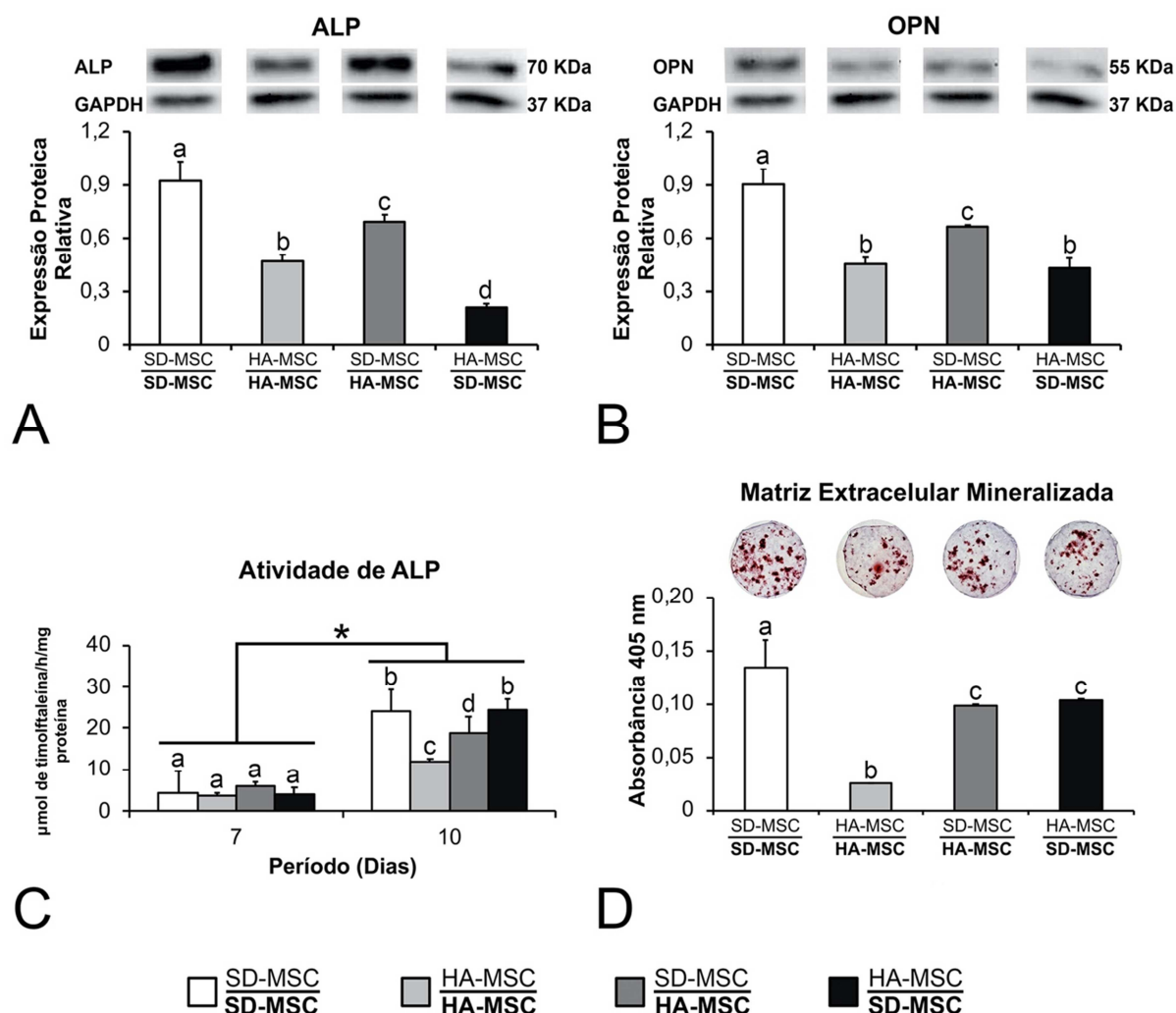


Figura 54. Expressão proteica relativa de fosfatase alcalina (ALP) (A) e osteopontina (OPN) (B) aos 10 dias, atividade de ALP aos 7 e 10 dias (C) e formação de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias (D) em coculturas indiretas SD-MSC→SD-MSC, HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC cultivadas em meio osteogênico. Letras e asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=5; p≤0,05).

3.3.3.7 Modulação da expressão de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nas interações entre SD-MSC e HA-MSC

Os heatmaps mostram os genes modulados em HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC nas vias de sinalização das BMP (Figura 55A), WNT (Figura 56A) e ITG (Figura 57A).

Na via de BMP, dos 63 genes avaliados, 51 foram diferencialmente expressos em HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 55B). Destes, 1 foi regulado positivamente somente em SD-MSC→HA-MSC (Figura 55C). Enquanto 21 foram

regulados negativamente somente em SD-MSC→HA-MSC e 1 somente em HA-MSC→SD-MSC (Figura 55D).

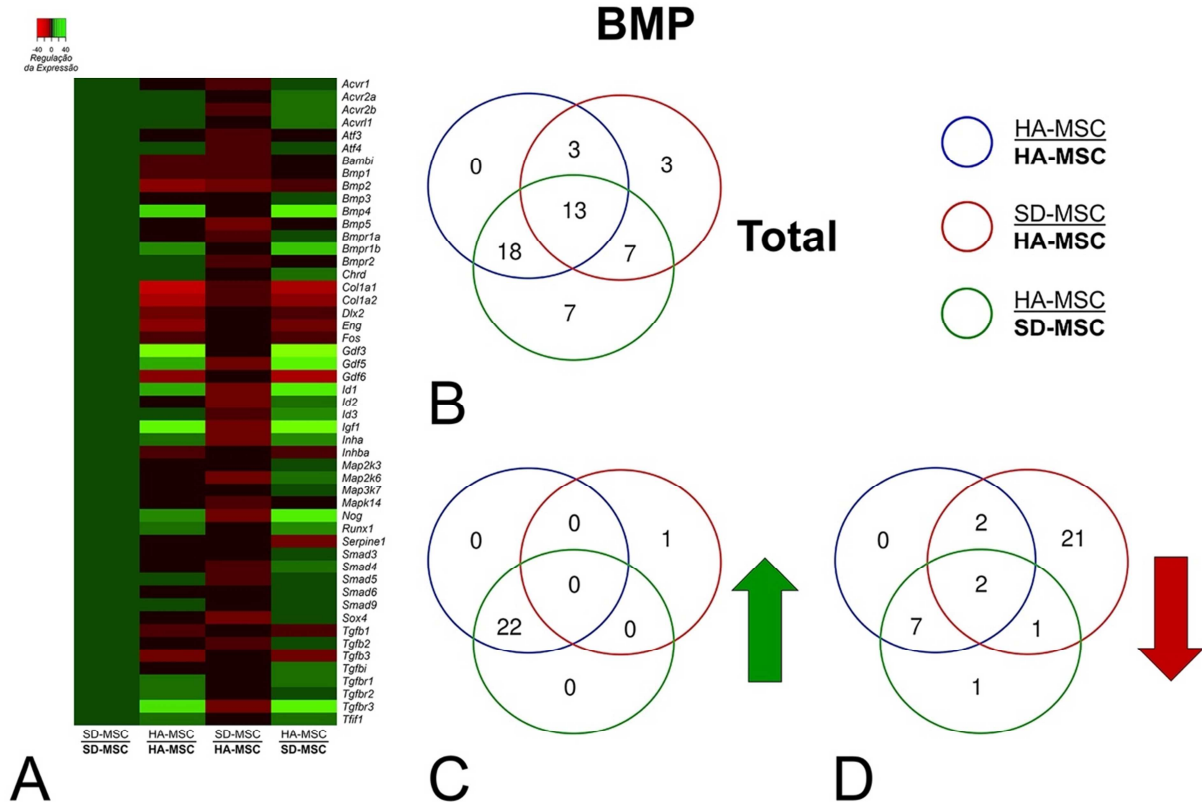


Figura 55. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de BMP, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de WNT, dos 63 genes avaliados, 51 foram diferencialmente expressos em HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 56B). Destes, 1 foi regulado positivamente somente em SD-MSC→HA-MSC e 13 somente em HA-MSC→SD-MSC (Figura 56C). Enquanto 2 foram regulados negativamente somente em HA-MSC→HA-MSC, 23 somente em SD-MSC→HA-MSC e 1 somente em HA-MSC→SD-MSC (Figura 56D).

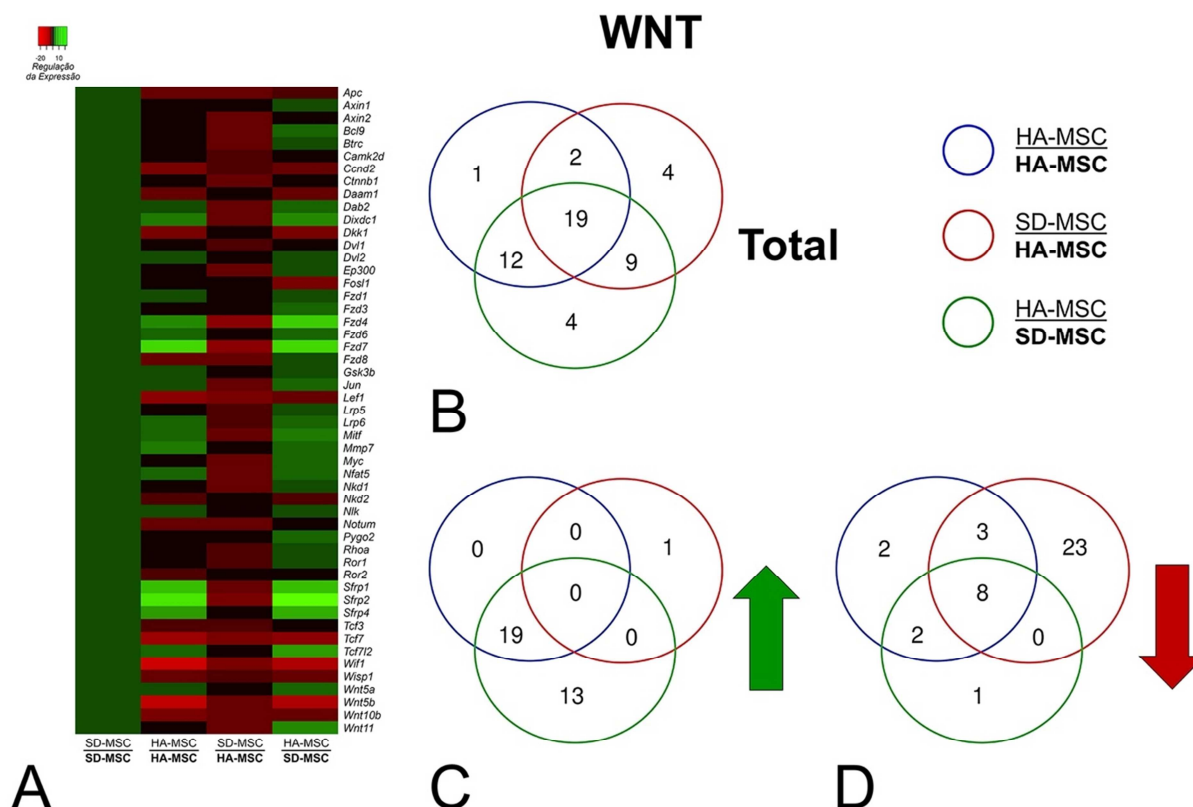


Figura 56. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de WNT, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Na via de ITG, dos 61 genes avaliados, 45 foram diferencialmente expressos em HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC (Figura 57B). Destes, 1 foi regulado positivamente somente em HA-MSC→HA-MSC, 1 somente em SD-MSC→HA-MSC e 12 somente em HA-MSC→SD-MSC (Figura 57C). Enquanto 3 foram regulados negativamente somente em HA-MSC→HA-MSC, 15 somente em SD-MSC→HA-MSC e 3 somente em HA-MSC→SD-MSC (Figura 57D).

Os genes regulados positiva ou negativamente são mostrados na Tabela 6.

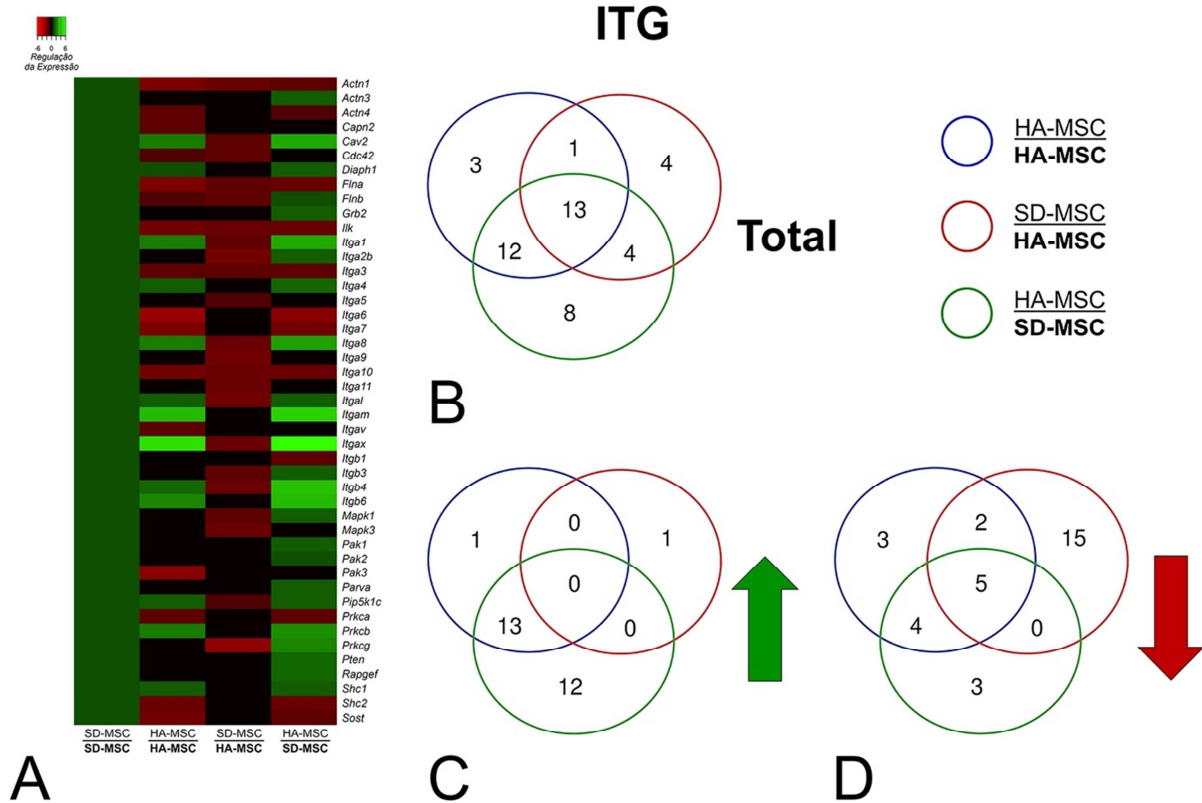


Figura 57. Heatmap mostrando genes diferencialmente expressos (verde - positivamente; vermelho - negativamente e preto - descartados) (A) e diagramas de Venn mostrando o número total de genes modulados (B), os genes regulados positiva (C) e negativamente (D) da via de ITG, entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC.

Tabela 6. Genes das vias de BMP, WNT e ITG regulados positiva ou negativamente entre HA-MSC→HA-MSC, SD-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC em comparação com SD-MSC→SD-MSC

Via	Coculturas	Genes regulados positivamente	Genes regulados negativamente
BMP	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	-	<i>Bmp2, Col1a1</i>
	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Bambi, Bmp1</i>
	HA-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	<i>Acvr2a, Acvr2b, Acvr11, Atf4, Bmp4, Bmpr1b, Bmpr2, Chrd, Gdf3, Gdf5, Id1, Id3, Igf1, Inha, Nog, Runx1, Smad5, Smad9, Tff1, Tgfr1, Tgfr2, Tgfr3</i>	<i>Dlx2, Eng, Fos, Gdf6, Inhba, Tgfb1, Tgfb3</i>
	SD-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	-	<i>Col1a2</i>
	SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Acvr1, Acvr2b, Atf3, Atf4, Bmp5, Bmpr1a, Bmpr2, Gdf5, Id1, Id2, Id3, Igf1, Inha, Map2k6, Mapk14, Nog, Smad4, Smad5, Sox4, Tgfb2, Tgfr3</i>
	HA-MSC→SD-MSC	-	<i>Serpine1</i>
	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	-	<i>Apc, Ccnd2, Lef1, Tcf7, Wif1, Wisp1, Wnt5b, Wnt10b</i>
	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Fzd8, Notum, Tcf3</i>
	SD-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	<i>Dab2, Dixdc1, Dvl2, Fzd1, Fzd4, Fzd6, Fzd7, Gsk3b, Jun, Lrp6, Mitf, Mmp7, Nfat5, Nlk, Sfrp1, Sfrp2, Sfrp4, Tcf7l2, Wnt5a</i>	<i>Dkk1, Nkd2</i>
	HA-MSC→HA-MSC	-	<i>Daam1, Ror2</i>
WNT	SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Axin2, Bcl9, Btrc, Camk2d, Ctnnb1, Dab2, Dixdc1, Dvl1, Ep300, Fzd4, Fzd7, Jun, Lrp5, Lrp6, Mitf, Myc, Nfat5, Nkd1, Rhoa, Ror1, Sfrp1, Sfrp2, Wnt11</i>
	HA-MSC→SD-MSC	<i>Axin1, Bcl9, Btrc, Ep300, Fzd3, Fzd8, Lrp5, Myc, Nkd1, Pygo2, Rhoa, Ror1, Wnt11</i>	<i>Fosl1</i>
	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	-	<i>Actn1, Flna, Ilk, Itga3, Itga10</i>
	HA-MSC→HA-MSC SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Cdc42, Flnb</i>
ITG	HA-MSC→HA-MSC HA-MSC→SD-MSC	<i>Cav2, Diaph1, Itga1, Itga4, Itga8, Itgal, Itgam, Itgax, Itgb4, Itgb6, Pip5k1c, Prkcb, Shc1</i>	<i>Actn4, Prkca, Shc2, Sost</i>
	HA-MSC→HA-MSC	<i>Itga7</i>	<i>Capn2, Itgav, Pak3</i>
	SD-MSC→HA-MSC	-	<i>Cav2, Itga1, Itga5, Itga8, Itga9, Itga11, Itga2b, Itgal, Itgax, Itgb3, Itgb4, Mapk1, Mapk3, Pip5k1c, Prkcg</i>
	HA-MSC→SD-MSC	<i>Actn3, Flnb, Grb2, Itga2b, Itgb3, Mapk1, Parva, Pak1, Pak2, Prkcg, Pten, Rapgef1</i>	<i>Itga6, Itga7, Itgb1</i>

3.3.4 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeção de SD-MSC em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

3.3.4.1 Avaliação do MHC classes I e II em SD-MSC

As SD-MSC utilizadas para o tratamento dos defeitos ósseos descritas nesse capítulo foram analisadas previamente quanto a expressão das moléculas do MHC classes I e II por citometria de fluxo e os resultados estão descritos no Capítulo 1, item 1.3.4.1.

3.3.4.2 Avaliação do tempo de permanência de SD-MSC injetadas nos defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

Os sinais de luminescência, gerados pela reação de D-luciferina com a luciferase expressa por SD-MSC e captados pelo IVIS Spectrum (Perkin Elmer) em calvárias de ratos com HA, mostraram que as células estavam presentes em uma área bem delimitada no interior do defeito, enquanto os animais Controle não apresentaram sinais de luminescência (Figura 58A-E). A quantificação da luciferina mostrou que o pico do sinal ocorreu no dia 1 pós injeção de células, reduzindo no dia 3, com uma queda de aproximadamente 75%, continuando a cair aproximadamente mais 7% no dia 5. No dia 8, o sinal detectado foi muito baixo não indicando a presença de células (Figura 58F).

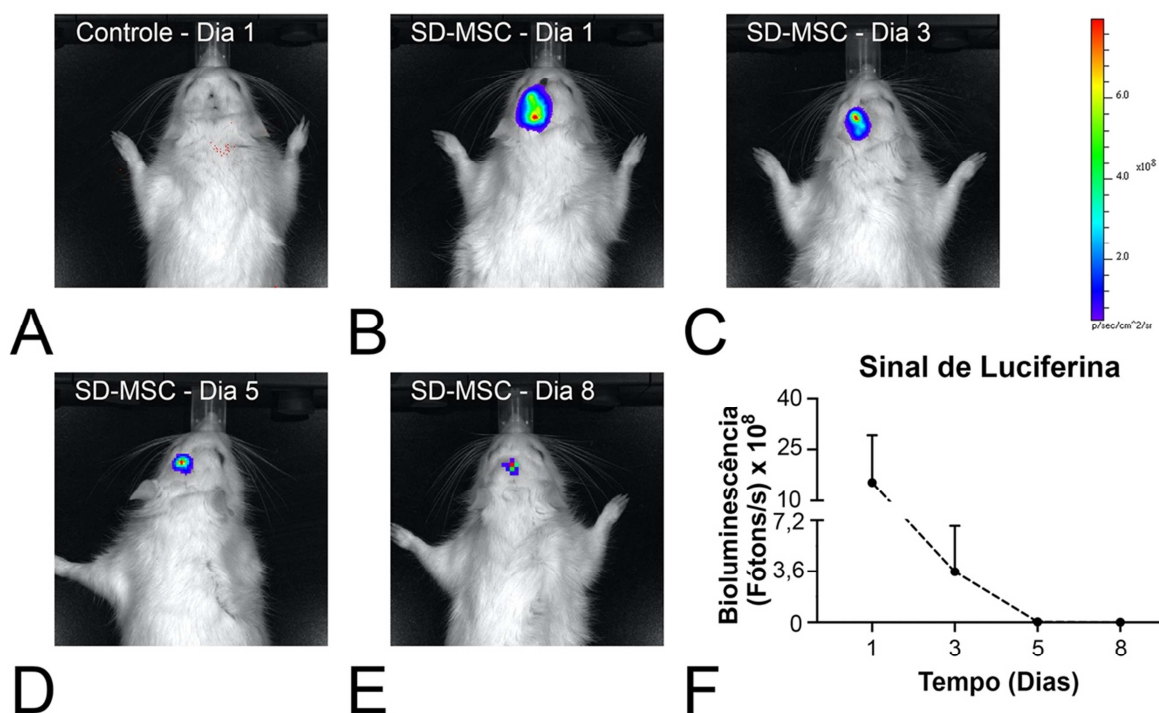


Figura 58. Imagens (A-E) e quantificação (F) do sinal de luminescência gerados pela luciferina injetada nos dias 1, 3, 5 e 8 pós injeção de SD-MSC transduzidas com luciferase em defeitos ósseos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial (HA). O animal Controle, com ausência de sinal, recebeu injeção de veículo (PBS) no dia 1. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=6).

3.3.4.3 Análises microtomográfica e morfométrica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

A análise das reconstruções microtomográficas 3D das calvárias de ratos com HA (Figura 59A,B) mostrou que, após 4 semanas da injeção de células, o tecido ósseo formado estava presente majoritariamente nas margens dos defeitos tratados com injeção de SD-MSC ou PBS. Contudo, houve maior formação óssea nos defeitos de animais tratados com SD-MSC em comparação com os Controles com o tecido ósseo avançando em direção ao centro do defeito (Figura 59A,B).

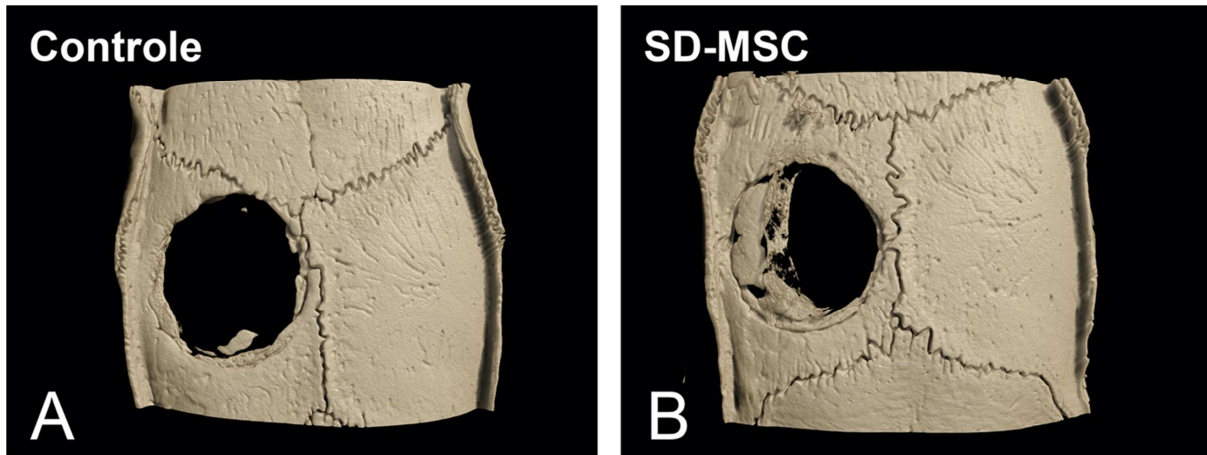


Figura 59. Reconstruções microtomográficas tridimensionais (A,B) da calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas.

As análises morfométricas das calvárias de ratos com HA (Figura 60A-F) mostraram que os parâmetros BV ($p=0,005$), BV/TV ($p=0,005$), BS ($p=0,001$) e Tb.N ($p=0,001$) foram maiores, nos defeitos de animais tratados com SD-MSC em comparação com o Controle, enquanto a Tb.SP foi menor ($p=0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa no parâmetro Tb.Th entre os grupos avaliados ($p=0,917$).

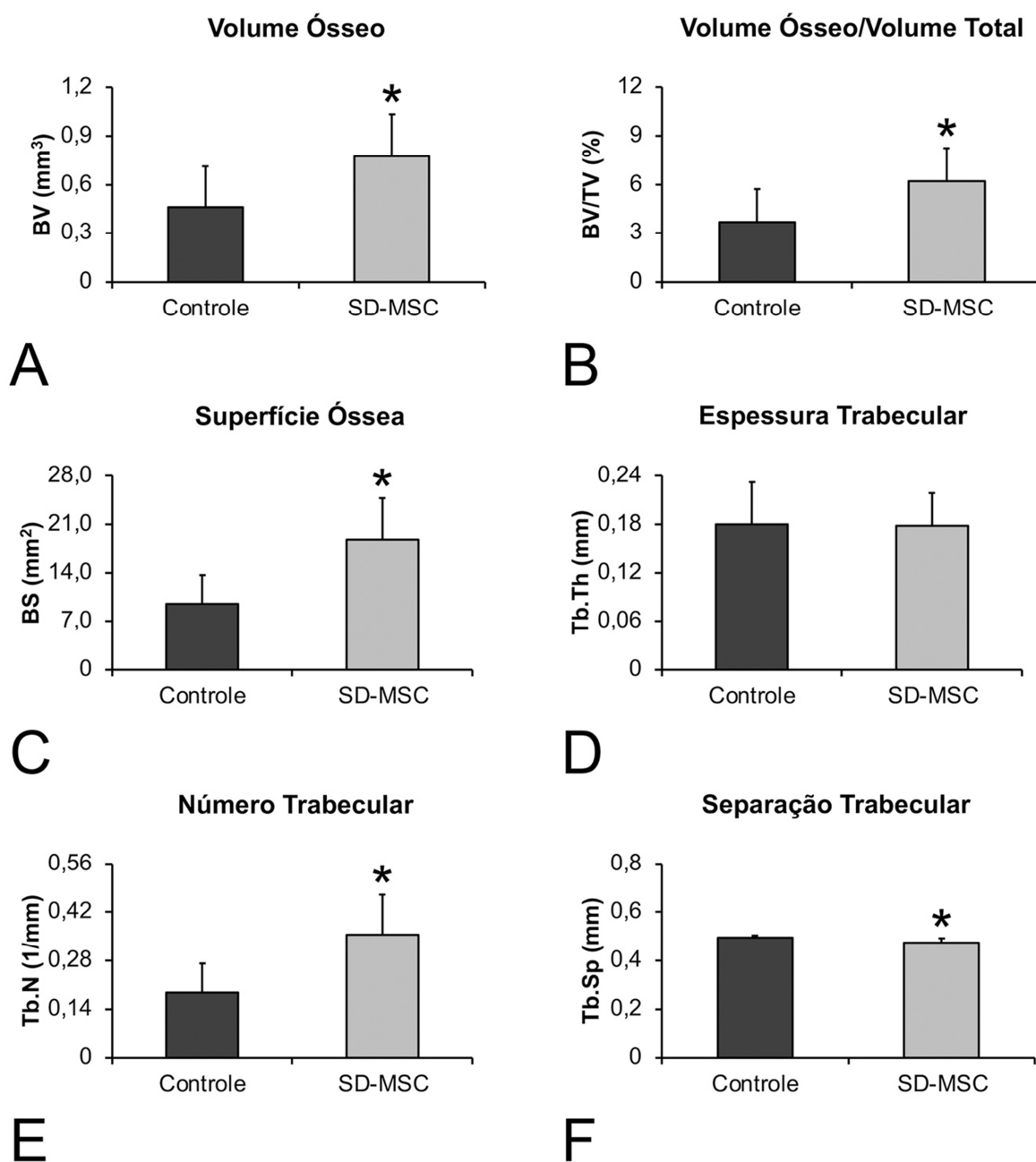


Figura 60. Parâmetros morfométricos (A-F) do tecido ósseo formado em defeitos criados em calvária de ratos com osteoporose, tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=12$).

3.3.4.4 Análise histológica do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

A análise histológica das calvárias de ratos com HA mostrou maior quantidade de tecido ósseo formado nos defeitos tratados com injeção de SD-MSC em relação ao Controle, corroborando os dados morfométricos gerados pela análise de μ CT (Figura 61A,B). Somente no centro dos defeitos tratados com células houve

formação óssea, enquanto que nas margens de todos os defeitos, notou-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas, osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea e osso formado (Figura 61C,D), sugerindo que o processo de formação óssea ocorria em todos os defeitos. Além disso, independente do tratamento, o osso formado apresentou características histológicas semelhantes, com tecido ósseo maduro com a presença de linha de cemento e caracterizado por lamelas dispostas paralelamente entre si, e tecido ósseo imaturo (Figura 61C-F). Não foram observados sinais inflamatórios em nenhum dos cortes histológicos.

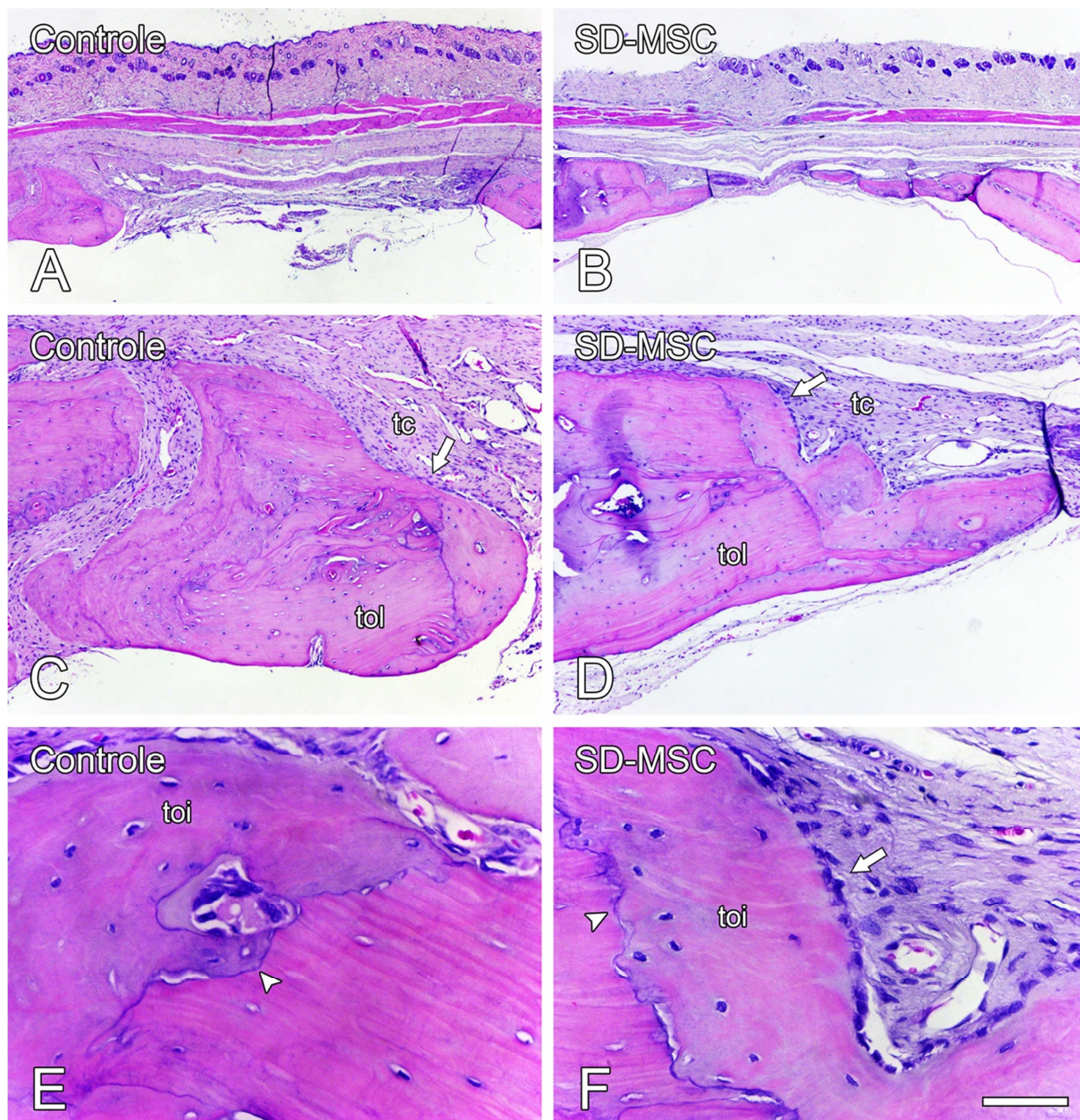


Figura 61. Microscopia de luz de defeitos ósseos criados em calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. No centro dos defeitos tratados com células houve formação óssea. Em todos os grupos observou-se tecido ósseo formado e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas desorganizadas e osteoblastos alinhados lado a lado na superfície óssea (A-D, setas). A área de tecido ósseo formado exibiu osso maduro e imaturo delimitados por uma linha de cimento (C-F, ponta de seta). Hematoxilina e eosina. setas: osteoblastos; ponta de seta: linha de cimento; tc: tecido conjuntivo; toi: tecido ósseo imaturo; tol: tecido ósseo lamelar. Barra de escala: A e B = 800 μ m; C e D = 200 μ m; E e F: 50 μ m.

3.3.4.5 Avaliação da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real do tecido ósseo formado em defeitos criados na calvária de ratos com hipertensão arterial

Em geral, a expressão relativa dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Oc* e *Opn* foi maior em tecidos colhidos de defeitos tratados com SD-MSC em comparação com o Controle ($p=0,001$, para todos os genes) (Figura 62A-F).

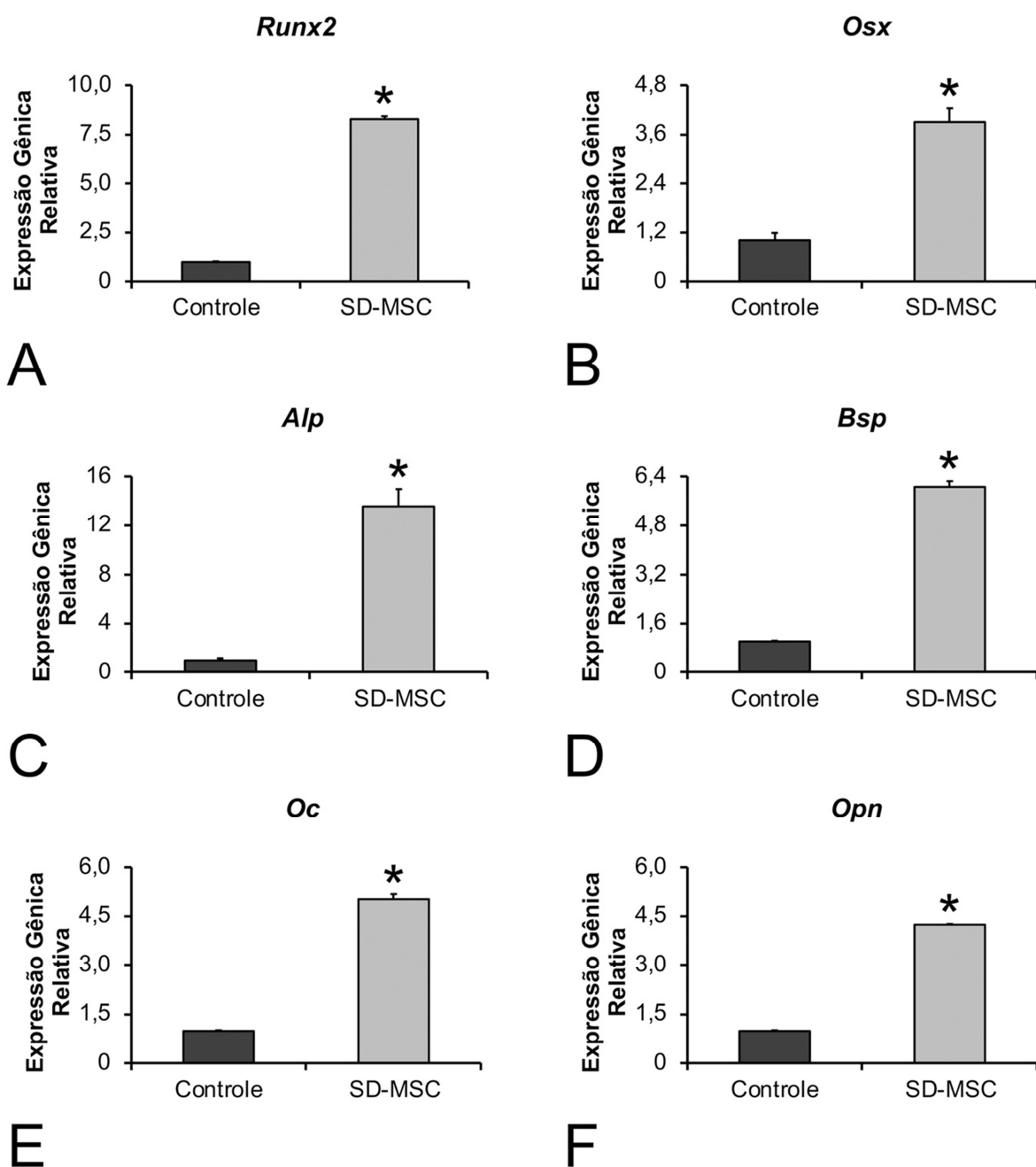


Figura 62. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E) e *Opn* (F) das células do osso formado em defeitos de calvária de ratos com hipertensão arterial (HA), tratados com injeção de células-tronco mesenquimais saudáveis (SD-MSC) ou veículo (PBS) sem células (Controle), ao final de 4 semanas. Asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da HA sobre o tecido ósseo in vivo e sobre a diferenciação osteoblástica de MSC in vitro; bem como o efeito da interação entre SD-MSC e HA-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de ambas as células e a eficácia da terapia celular através de injeção local de SD-MSC para regenerar defeitos ósseos de calvária de ratos acometidos pela HA.

Inicialmente, escolhemos ratos SHR pois tem sido amplamente utilizado como modelo de HA induzida geneticamente por mutações e com variáveis ambientais controladas. As reconstruções 3D dos fêmures dos animais com HA e a análise dos parâmetros morfométricos gerados por μ CT mostraram que a HA resultou em efeitos prejudiciais ao tecido ósseo, assim como demonstrado anteriormente, onde houve alterações esqueléticas e do metabolismo ósseo causados nesses animais (TIYASATKULKOVIT et al., 2019; MANRIQUE et al., 2015; LEE et al., 2014). Além disso, a DM prejudica a função de MSC endógenas, alterando negativamente sua proliferação e diferenciação (CHAVES NETO et al., 2018; LANDIM DE BARROS et al., 2016).

Nesse contexto, o presente estudo mostrou que, embora as HA-MSC possuíssem capacidade de diferenciação osteoblástica, o seu potencial osteogênico foi prejudicado em comparação com NT-MSC, como visto através da atividade de ALP e formação de matriz extracelular mineralizada reduzidas, corroborando com estudos anteriores (TIYASATKULKOVIT et al., 2019; CHAVES NETO et al., 2018; LANDIM DE BARROS et al., 2016). Além disso, apesar de NT-MSC não proliferarem a partir do sétimo dia e HA-MSC não proliferarem, o número de HA-MSC foi menor que NT-MSC em todos os períodos de proliferação celular avaliados, semelhante ao observado anteriormente (LANDIM DE BARROS et al., 2016). Dessa forma, como as MSC contribuem para a manutenção da homeostase óssea sendo fonte de progenitores para os osteoblastos, agentes anabólicos e reguladores da osteoclastogênese (KFOURY; SCADDEN, 2018), os resultados sugerem que ao menos em parte, a perda óssea na HA pode estar relacionada à redução da capacidade de diferenciação osteoblástica de MSC, semelhante ao observado em outros estudos (TIYASATKULKOVIT et al., 2019; CHAVES NETO et al., 2018; LANDIM DE BARROS et al., 2016). Por outro lado, a baixa taxa de proliferação estaria relacionada com a redução da capacidade de autorrenovação, sugerindo que

na medula óssea do modelo in vivo de HA utilizado nesse estudo, pode haver um esgotamento gradual das fontes de MSC, contribuindo para o prejuízo ao tecido ósseo provocado pela doença.

As MSC podem ser uma fonte promissora para terapia celular com vistas ao reparo de defeitos ósseos em pacientes com HA como discutido no capítulo 1. Considerando que na terapia celular as MSC podem atuar de forma parácrina (SHAO; ZHANG; YANG, 2015), nesse estudo decidiu-se avaliar in vitro o efeito de SD-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de HA-MSC e vice-versa através de cocultura indireta.

As SD-MSC e HA-MSC utilizadas nesse estudo foram obtidas e cultivadas como descrito por Freitas et al. (2020) e caracterizadas como MSC por apresentarem alta porcentagem de células expressando CD29 e CD90 e baixa porcentagem de células expressando os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 e endotelial CD31. Curiosamente, houve baixa porcentagem de células expressando CD44 e CD106, também característicos de MSC. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos e discutidos no capítulo 1.

As avaliações das interações entre SD-MSC e HA-MSC mostraram que, de maneira geral, todas as coculturas apresentaram, o mesmo padrão de crescimento com o número de células aumentando ao longo do tempo. Com exceção do décimo dia em que HA-MSC cultivada na presença de SD-MSC e vice-versa apresentaram maior número de células, nos demais períodos esse número foi maior em HA-MSC independentemente do tipo celular com a qual foi cultivada. Por outro lado, as SD-MSC cultivadas na presença de SD-MSC ou HA-MSC apresentaram maior expressão gênica dos marcadores osteoblásticos analisados, ao mesmo tempo que foi menor em HA-MSC cultivadas na presença de SD-MSC ou HA-MSC. Portanto, em termos de expressão gênica, SD-MSC não promoveu efeitos em HA-MSC e vice-versa. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que os efeitos prejudiciais da HA ao tecido ósseo estão relacionados a menor expressão gênica de marcadores osteoblásticos. As análises do fenótipo celular confirmaram a menor diferenciação osteoblástica das HA-MSC como observado pela menor expressão proteica e atividade de ALP e menor formação de matriz mineralizada nas coculturas HA-MSC→HA-MSC. Por outro lado, a diferenciação osteoblástica foi recuperada parcialmente quando as HA-MSC foram cultivadas na presença de SD-MSC, que por sua vez tiveram sua diferenciação prejudicada quando na presença das HA-MSC.

Como discutido no capítulo 1, as vias das BMP, WNT e ITG são de fundamental importância para o processo de diferenciação osteoblástica que ocorre na interação entre essas células. A análise do PCR array das coculturas realizado aos 10 dias de cultura mostrou que as interações estudadas afetam as vias de sinalização das BMP, WNT e ITG de maneira complexa e que precisam ser melhores e mais detalhadamente estudadas para o melhor entendimento de como a HA afeta essas vias. Em geral, vários genes das três vias foram regulados positivamente em HA-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC e nenhum gene foi regulado positivamente em SD-MSC→HA-MSC. Nesse contexto, a recuperação parcial da diferenciação osteoblástica de HA-MSC quando cultivadas com SD-MSC, como visto na formação de matriz extracelular mineralizada pode estar relacionada, ao menos em parte, à modulação positiva de outras vias de sinalização não avaliadas nesse estudo. Por outro lado, essas vias podem estar moduladas negativamente, resultando na diferenciação osteoblástica reduzida de HA-MSC→HA-MSC e HA-MSC→SD-MSC, contrapondo à modulação positiva das vias das BMP, WNT e ITG avaliadas nesse estudo.

Devemos considerar ainda a complexidade da diferenciação osteoblástica, onde muitos genes das vias avaliadas participam de funções biológicas diversas, tais como proliferação, diferenciação e migração celular, desenvolvimento embrionário e esquelético, formação óssea, remodelação e reparo tecidual, defesa do hospedeiro e homeostasia. (YAN et al., 2022; YU et al., 2021; COSTANTINI et al., 2018; PERSSON et al., 2019; HENDRICKX et al., 2017; DOCHEVA et al., 2014; LIU et al., 2013; MULLIN et al., 2013; KATOH; KATOH, 2007).

A ausência de correlação entre os achados genotípicos e fenotípicos encontrada neste estudo pode ser explicada, ao menos em parte, por mecanismos epigenéticos pós-transcricionais discutidos no capítulo 1, ou modulação de genes de outras vias de sinalização, com diferentes receptores e transdutores de sinal. De fato, recentemente foi mostrado a participação da via de sinalização de AMP cíclico e a participação do receptor adrenérgico $\beta 1$ no desenvolvimento da HA e na diferenciação osteoblástica de MSC obtidas de ratos com HA (ALVES BARRETO et al., 2021; GUAN; ZHOU; LI, 2011).

Embora neste estudo não se tenha feito qualquer avaliação para determinar os mecanismos envolvidos nos efeitos observados de SD-MSC sobre HA-MSC e vice-versa, considerando que os resultados foram obtidos por meio de experimentos

de cocultura, é certo que ocorreram devido ao efeito parácrino, como discutido no capítulo 1.

A terapia celular tem atraído considerável atenção da comunidade científica para o tratamento de diversas condições clínicas em pacientes com HA, ou para tratar a doença em si (STROJNY et al., 2021; JUNIOR; DOS REIS LÍVERO, 2018; WANG et al., 2015). À semelhança do discutido no capítulo 1, nesse estudo foram utilizadas MSC alógenas jovens e saudáveis como estratégia para reparar defeitos ósseos de ratos com HA.

Em relação à reação devido o uso clínico de SD-MSC alógenas em terapia celular, confirmando os resultados descritos no capítulo 1, houve baixa porcentagem de SD-MSC expressando ambos MHC classes I e II, permitindo assim que fossem utilizadas com riscos mínimos para os ratos em que foram injetadas.

Na terapia celular, observamos que a permanência das células nos defeitos ósseos foi afetada pela doença. Após injeção, as células permaneceram na região dos defeitos ósseos criados na calvária dos ratos com HA por um período de até 5 dias, diferentemente de estudos anteriores, os quais, utilizando ratos saudáveis observaram que as células permaneceram na região dos defeitos por até 14 dias (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Ao menos em parte, esses resultados diferentes podem ser explicados pelo fato que o ambiente doente nos defeitos de ratos com HA pode ser mais hostil às células e além da doença, esses animais eram mais velhos comparados aos animais dos estudos citados anteriormente (FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b). Além disso, estudos relatam que uma vida útil curta das células injetadas também pode ser resultado do estresse físico da injeção, inflamação local, desnutrição e hipóxia (ROSENSTRAUCH et al., 2005; SORTWELL; PITZER; COLLIER, 2000). Embora os outros fatores não tenham sido avaliados pelo nosso grupo de estudo, certamente o estresse físico da injeção não é um fator relevante porque o método utilizado para injetar as MSC não interfere com sua viabilidade (FREITAS et al., 2019a).

A respeito da formação óssea obtida nos defeitos desses animais, as reconstruções 3D e os parâmetros morfométricos gerados por μ CT mostraram maior formação óssea nos defeitos tratados com injeção local de SD-MSC comparados ao Controle. A normalização do parâmetro BV/TV do tratamento com SD-MSC pelo com PBS, como preconizado por Freitas et al. (2021), é de 1,69, indicando que a formação óssea pelas SD-MSC é uma vez e meia maior do que a induzida por PBS.

Esses resultados estão de acordo com a análise histológica que mostrou tecido ósseo formado nos defeitos que receberam injeção local de células, enquanto no grupo Controle foi observado predominância de tecido conjuntivo. Esses achados são corroborados por outros estudos (ADOLPHO et al., 2022; SOUZA et al., 2020; FREITAS et al., 2019a; FREITAS et al., 2019b; SOUZA et al., 2018) que utilizaram a mesma estratégia de terapia celular, através de injeção local de células em defeitos ósseos criados na calvária de ratos, mesmo na presença de osteoporose, como discutido no capítulo 1

Alguns aspectos moleculares do osso formado através de injeção local de SD-MSC também foram investigados pela expressão gênica de alguns marcadores osteoblásticos, que traduzem proteínas características de formação óssea. A expressão de todos os genes avaliados foi maior nos tecidos formados pela injeção de células em comparação com o Controle, no entanto, nesse estudo não foi avaliada a expressão gênica do osso nativo, portanto, não é possível afirmar se a assinatura molecular do tecido ósseo formado se aproxima ou não daquele original.

Nesse estudo, nós demonstramos que SD-MSC recuperam parcialmente o potencial osteogênico de HA-MSC e a terapia celular baseada em injeções locais de SD-MSC foi efetiva em induzir formação óssea significativa, mesmo na presença de HA, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias baseadas em células para regenerar tecido ósseo de pacientes que sofrem de distúrbios metabólicos, como a HA.

3.5 CONCLUSÕES

- A HA prejudica o tecido ósseo e a diferenciação osteoblástica de MSC.
- A diferenciação osteoblástica de HA-MSC é recuperada parcialmente quando essas células são cultivadas com SD-MSC, enquanto a diferenciação osteoblástica destas últimas é prejudicada quando são cultivadas com HA-MSC.
- A injeção local de SD-MSC resulta em maior formação óssea comparada à injeção de PBS.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, avaliamos 1) o efeito da osteoporose, DM ou HA sobre o tecido ósseo e diferenciação osteoblástica de MSC derivadas da medula óssea; 2) a influência de SD-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de ORX-MSC, DM-MSC ou HA-MSC, e destas sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSC; e 3) o potencial de SD-MSC derivadas da medula óssea para regenerar o tecido ósseo quando injetadas diretamente em defeitos de 5 mm de diâmetro criados em calvárias de ratos com osteoporose, DM ou HA.

Observamos que as doenças prejudicam o tecido ósseo e a diferenciação osteoblástica de MSC, e que a presença de SD-MSC com ORX-MSC, DM-MSC ou HA-MSC recupera parcialmente a diferenciação osteoblástica dessas últimas. Por outro lado, quando avaliamos os efeitos das ORX-MSC, DM-MSC ou HA-MSC sobre a diferenciação osteoblástica de SD-MSC, observamos que as ORX-MSC não afetam essa diferenciação, as DM-MSC prejudicam pouco e as HA-MSC prejudicam ainda mais esse processo. Nessas interações, há o envolvimento da modulação de genes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG em diferentes graus.

Na terapia celular, inicialmente observamos que a permanência das células nos defeitos ósseos foi afetada pelas doenças. Na presença de osteoporose e HA as MSC foram detectadas até o 5º. dia, mas na DM elas foram observadas até o 8º. dia, havendo redução no tempo de permanência das células em comparação com animais saudáveis, nos quais as MSC são detectadas até o 14º. dia (FREITAS et al., 2019a). Interessante observar que o tempo de permanência das células não se correlaciona com a formação óssea porque nos animais com osteoporose e HA houve reparação parcial dos defeitos, mas nos animais com DM não foi observada formação óssea em comparação com o Controle. Tal ausência de correlação indica que a atuação mais relevante das MSC na terapia celular se dá por efeito parácrino nas células já presentes no ambiente do defeito ósseo e deve ser mais importante nos períodos mais iniciais. A normalização do parâmetro microtomográfico BV/TV dos tratamentos com MSC pelos respectivos tratamentos com PBS, como preconizado por Freitas et al. (2021), permite a comparação da eficácia da terapia celular nas três doenças estudadas. Assim, para a osteoporose esse valor é de 2,06, indicando que a formação óssea pelas MSC é duas vezes maior do que a induzida por PBS, para a DM é de 0,99 e para a HA, 1,69. Isso sugere que a doença mais

desafiadora para a formação óssea é a DM seguida pela HA e osteoporose. No entanto, independente das doenças avaliadas, não obtivemos regeneração completa dos defeitos ósseos, portanto, esse modelo de estudo na osteoporose, DM e HA continua a ser um desafio que merece investigações adicionais.

Como desdobramento desse trabalho, estratégias futuras poderiam ser baseadas na utilização de MSC condicionadas por tratamentos prévios que pudessem aumentar seu potencial terapêutico. Tais condicionamentos poderiam ser a combinação de MSC com fatores de crescimento sabidamente relevantes para o processo de angiogênese e/ou osteogênese, a edição gênica de MSC para sobreexpressar, isoladamente ou em conjunto, esses fatores de crescimento, submetê-las à hipóxia, cultivá-las em superfícies nanoestruturadas ou ainda combinar MSC com microvesículas liberadas pelas próprias MSC, isoladamente ou em conjunto com células, no intuito de se obter a completa regeneração do tecido ósseo. Tais estratégias estão sendo exploradas dentro do nosso grupo de pesquisa como consequência do desenvolvimento deste e de outros projetos abordando a terapia celular e a regeneração óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuna RPF, Almeida LO, Souza ATP, Fernandes RR, Sverzut TFV, Rosa AL, Beloti MM. Osteoporosis and osteoblasts cocultured with adipocytes inhibit osteoblast differentiation by downregulating histone acetylation. *J Cell Physiol.* 2021;236:3906-3917.

Abuna RPF, Oliveira FS, Adolpho LF, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. Frizzled 6 disruption suppresses osteoblast differentiation induced by nanotopography through the canonical Wnt signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2020;235:8293-8303.

Adolpho LF, Lopes HB, Freitas GP, Weffort D, Campos Totoli GG, Loyola Barbosa AC, Freire Assis RI, Silverio Ruiz KG, Andia DC, Rosa AL, Beloti MM. Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. *Regen Med.* 2022;17:341-353.

Ajami E, Mahno E, Mendes VC, Bell S, Moineddin R, Davies JE. Bone healing and the effect of implant surface topography on osteoconduction in hyperglycemia. *Acta Biomater.* 2014;10:394-405.

Al-Qarakhli AMA, Yusop N, Waddington RJ, Moseley R. Effects of high glucose conditions on the expansion and differentiation capabilities of mesenchymal stromal cells derived from rat endosteal niche. *BMC Mol Cell Biol.* 2019;20:51.

Alves Barreto AE, Balera Brito VG, Patrocinio MS, Ballassoni BB, Tfaile Frasnelli SC, Penha Oliveira SH. β 1-adrenergic receptor but not β 2 mediates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2021;911:174515.

American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care.* 2022;45:S17-S38.

Andrzejowski P, Giannoudis PV. The 'diamond concept' for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol.* 2019;20:21.

Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci.* 2004;117:5655-5664.

Arai Y, Choi B, Kim BJ, Park S, Park H, Moon JJ, Lee SH. Cryptic ligand on collagen matrix unveiled by MMP13 accelerates bone tissue regeneration via MMP13/Integrin α 3/RUNX2 feedback loop. *Acta Biomater.* 2021;125:219-230.

Arjmand B, Sarvari M, Alavi-Moghadam S, Payab M, Goodarzi P, Gilany K, Mehrdad N, Larijani B. Prospect of Stem Cell Therapy and Regenerative Medicine in Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:430.

Armada L, Nogueira CR, Neves UL, dos Santos Souza P, Detogne JP, Armada-Dias L, Moreira RM, Nascimento-Saba CC. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats. *Oral Dis.* 2006;12:181-186.

Ashe HL. Modulation of BMP signalling by integrins. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1465-1473.

Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 2010;20:121-133.

Bagi CM, Edwards K, Berryman E. Metabolic Syndrome and Bone: Pharmacologically Induced Diabetes has Deleterious Effect on Bone in Growing Obese Rats. *Calcif Tissue Int.* 2018;102:683-694.

Baker N, Boyette LB, Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone.* 2015;70:37-47.

Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, Barbagallo CM, Boiardi L, Passeri G, Arlunno B, Delsignore R, Passeri M. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience.* 199;2:15-17.

Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM, Machado CA, Poli-de-Figueiredo CE, Amodeo C, Mion Júnior D, Barbosa ECD, Nobre F, Guimarães ICB, Vilela-Martin JF, Yugar-Toledo JC, Magalhães MEC, Neves MFT, Jardim PCBV, Miranda RD, Póvoa RMDS, Fuchs SC, Alessi A, Lucena AJG, Avezum A, Sousa ALL, Pio-Abreu A, Sposito AC, Pierin AMG, Paiva AMG, Spinelli ACS, Nogueira ADR, Dinamarco N, Eibel B, Forjaz CLM, Zanini CRO, Souza CB, Souza DDSM, Nilson EAF, Costa EFA, Freitas EV, Duarte EDR, Muxfeldt ES, Lima Júnior E, Campana EMG, Cesarino EJ, Marques F, Argenta F, Consolim-Colombo FM, Baptista FS, Almeida FA, Borelli FAO, Fuchs FD, Plavnik FL, Salles GF, Feitosa GS, Silva GVD, Guerra GM, Moreno Júnior H, Finimundi HC, Back IC, Oliveira Filho JB, Gemelli JR, Mill JG, Ribeiro JM, Lotaif LAD, Costa LSD, Magalhães LBNC, Drager LF, Martin LC, Scala LCN, Almeida MQ, Gowdak MMG, Klein MRST, Malachias MVB, Kuschnir MCC, Pinheiro ME, Borba MHE, Moreira Filho O, Passarelli Júnior O, Coelho OR, Vitorino PVO, Ribeiro Junior RM, Esporcatte R, Franco R, Pedrosa R, Mulinari RA, Paula RB, Okawa RTP, Rosa RF, Amaral SLD, Ferreira-Filho SR, Kaiser SE, Jardim TSV, Guimarães V, Koch VH, Oigman W, Nadruz W. Brazilian Guidelines of Hypertension - 2020. *Arq Bras Cardiol.* 2021;116:516-658.

Baschant U, Rauner M, Balaian E, Weidner H, Roetto A, Platzbecker U, Hofbauer LC. Wnt5a is a key target for the pro-osteogenic effects of iron chelation on osteoblast progenitors. *Haematologica.* 2016;101:1499-1507.

Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res.* 2010;24:170-176.

Beloti MM, Sicchieri LG, de Oliveira PT, Rosa AL. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:999-1005.

Bhardwaj N, Devi D, Mandal BB. Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and stimulating factors. *Macromol Biosci.* 2015;15:153-182.

Brunner M, Mandier N, Gautier T, Chevalier G, Ribba AS, Guardiola P, Block MR, Bouvard D. β 1 integrins mediate the BMP2 dependent transcriptional control of osteoblast differentiation and osteogenesis. *PLoS One*. 2018;13:e0196021.

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

Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129:1314-1320.

Bueno NP, Copete IN, Lopes HB, Arany PR, Marques MM, Ferraz EP. Recovering the osteoblastic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from diabetic rats by photobiomodulation therapy. *J Biophotonics*. 2021;14:e202000393.

Bueno NP, Kfoury CC, Copete IN, de Oliveira FS, Arany P, Marques MM, Ferraz EP. Photobiomodulation treatments drive osteogenic versus adipocytic fate of bone marrow mesenchymal stem cells reversing the effects of hyperglycemia in diabetes. *Lasers Med Sci*. 2022. Epub ahead of print.

Campbell NRC, Paccot Burnens M, Whelton PK, Angell SY, Jaffe MG, Cohn J, Espinosa Brito A, Irazola V, Brettler JW, Roccella EJ, Maldonado Figueredo JI, Rosende A, Ordunez P. 2021 World Health Organization guideline on pharmacological treatment of hypertension: Policy implications for the region of the Americas. *Lancet Reg Health Am*. 2022;9:None.

Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*. 1999;354:971-975.

Chakravorty N, Hamlet S, Jaiprakash A, Crawford R, Oloyede A, Alfarsi M, Xiao Y, Ivanovski S. Pro-osteogenic topographical cues promote early activation of osteoprogenitor differentiation via enhanced TGF β , Wnt, and Notch signaling. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25:475-486.

Chaves Neto AH, Brito VGB, Landim de Barros T, do Amaral CCF, Sumida DH, Oliveira SHP. Chronic high glucose and insulin stimulate bone-marrow stromal cells adipogenic differentiation in young spontaneously hypertensive rats. *J Cell Physiol*. 2018;233:6853-6865

Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8:272-88.

Chen G, Huang G, Lin H, Wu X, Tan X, Chen Z. MicroRNA-425-5p modulates osteoporosis by targeting annexin A2. *Immun Ageing*. 2021;18:45.

Chen S, Du K, Zou C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:275.

Chen YS, Lian WS, Kuo CW, Ke HJ, Wang SY, Kuo PC, Jahr H, Wang FS. Epigenetic Regulation of Skeletal Tissue Integrity and Osteoporosis Development. *Int J Mol Sci*. 2020;21:4923.

Chin KY, Ima-Nirwana S. Sex steroids and bone health status in men. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:208719.

Chin KY, Ima-Nirwana S. The effects of orchidectomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. *Aging Male.* 2015;18:60-66.

Choi SW, Yeon JT, Ryu BJ, Kim KJ, Moon SH, Lee H, Lee MS, Lee SY, Heo JC, Park SJ, Kim SH. Repositioning Potential of PAK4 to Osteoclastic Bone Resorption. *J Bone Miner Res.* 2015;30:1494-1507.

Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149:1192-1205.

Cooley H, Jones G. A population-based study of fracture incidence in southern Tasmania: lifetime fracture risk and evidence for geographic variations within the same country. *Osteoporos Int.* 2001;12:124-130.

Costantini A, Tournis S, Kämpe A, Ul Ain N, Taylan F, Doulgeraki A, Mäkitie O. Autosomal Recessive Osteogenesis Imperfecta Caused by a Novel Homozygous COL1A2 Mutation. *Calcif Tissue Int.* 2018;103:353-358.

Cunha JS, Ferreira VM, Maquigussa E, Naves MA, Boim MA. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell Tissue Res.* 2014;358:249-256.

Cursino, NM. Caracterização de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). 2014. 50 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Dahabreh Z, Panteli M, Pountos I, Howard M, Campbell P, Giannoudis PV. Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: An in-vitro study. *World J Stem Cells.* 2014;6:497-504.

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

Dickhout JG, Lee RM. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1998;274:H794-H800.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20:5-14.

Docheva D, Popov C, Alberton P, Aszodi A. Integrin signaling in skeletal development and function. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102:13-36.

Doris PA. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Genomics.* 2017;49:601-617.

Du JH, Lin SX, Wu XL, Yang SM, Cao LY, Zheng A, Wu JN, Jiang XQ. The Function of Wnt Ligands on Osteocyte and Bone Remodeling. *J Dent Res.* 2019;98:930-938.

Duarte VM, Ramos AM, Rezende LA, Macedo UB, Brandão-Neto J, Almeida MG, Rezende AA. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab.* 2005;23:58-68.

Duell BL, Cripps AW, Schembri MA, Ulett GC. Epithelial cell coculture models for studying infectious diseases: benefits and limitations. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:852419.

Dufrane D. Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Cell Transplant.* 2017;26:1496-1504.

Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol.* 2014;5:148.

Erben RG. Skeletal effects of androgen withdrawal. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1:225-233.

Fazan VPS, Kalil ALR, Alcântara ACL, Genari AB, Tavares MR, Rodrigues AR, Salgado HC. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. *Medicina.* 2006;39:39-50.

Fideles SOM, Ortiz AC, Assis AF, Duarte MJ, Oliveira FS, Passos GA, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2019 Epub ahead of print.

Fijany A, Sayadi LR, Khoshab N, Banyard DA, Shaterian A, Alexander M, Lakey JRT, Paydar KZ, Evans GRD, Widgerow AD. Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. *Mol Biol Rep.* 2019;46:1459-1475.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Abuna RPF, Gimenes R, Souza LEB, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Potential of Osteoblastic Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue Associated with a Polymer/Ceramic Composite to Repair Bone Tissue. *Calcif Tissue Int.* 2017;101:312-320.

Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Gomes MPO, Quiles GK, Gordon J, Tye C, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 by CRISPR-Cas9 present high in vitro osteogenic potential and enhance in vivo bone formation. *Gene Ther.* 2021;28:748-759.

Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Coelho PG, Ferreira FU, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. *Regen Med.* 2019;14:1107-1119.

Freitas GP, Lopes HB, Souza ATP, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Souza LEB, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Cell Therapy: Effect of Locally Injected

Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow or Adipose Tissue on Bone Regeneration of Rat Calvarial Defects. *Sci Rep.* 2019;9:13476.

Freitas GP, Souza ATP, Lopes HB, Trevisan RLB, Oliveira FS, Fernandes RR, Ferreira FU, Ros FA, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Culture, Characterization and Differentiation. *Bio Protoc.* 2020;10:e3534.

Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2005;16:1506-1512.

Ghodsi M, Larijani B, Keshtkar AA, Nasli-Esfahani E, Alatab S, Mohajeri-Tehrani MR. Mechanisms involved in altered bone metabolism in diabetes: a narrative review. *J Diabetes Metab Disord.* 2016;15:52.

Giorgio Calori M, Capanna R, Colombo M, De Biase P, O'Sullivan C, Cartareggia V, Conti C. Cost effectiveness of tibial nonunion treatment: A comparison between rhBMP-7 and autologous bone graft in two Italian centres. *Injury.* 2013;44:1871-1879.

Goergen J, Wenisch S, Raabe O, Moritz A, Schlewitz G, Schnettler R, Hempel U, Heiss C, Arnhold S. Characterization of bone-marrow-derived stem cells in osteoporotic models of the rat. *ISRN Stem Cells.* 2013.

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

Gong W, Zhang N, Cheng G, Zhang Q, He Y, Shen Y, Zhang Q, Zhu B, Zhang Q, Qin L. *Rehmannia glutinosa* Libosch Extracts Prevent Bone Loss and Architectural Deterioration and Enhance Osteoblastic Bone Formation by Regulating the IGF-1/PI3K/mTOR Pathway in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3964.

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

Guan XX, Zhou Y, Li JY. Reciprocal roles of angiotensin II and Angiotensin II Receptors Blockade (ARB) in regulating Cbfa1/RANKL via cAMP signaling pathway: possible mechanism for hypertension-related osteoporosis and antagonistic effect of ARB on hypertension-related osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2011;12:4206-4213.

Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury.* 2014;45 Suppl 2:S3-S7.

Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone.* 2009;45 Suppl 1:S35-S8.

Haney EM, Bliziotis MM. Male osteoporosis: new insights in an understudied disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20:423-428.

Hankenson KD, Zimmerman G, Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S8-S15.

Harkness JE, Wagner JE. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3.ed. São Paulo: Roca. 1993;48-55.

Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019;8:467.

Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2008;10:243-253.

Heilmeyer U, Hackl M, Schroeder F, Torabi S, Kapoor P, Vierlinger K, Eiriksdottir G, Gudmundsson EF, Harris TB, Gudnason V, Link TM, Grillari J, Schwartz AV. Circulating serum microRNAs including senescent miR-31-5p are associated with incident fragility fractures in older postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Bone*. 2022;158:116308.

Hendrickx G, Boudin E, Steenackers E, Nielsen TL, Andersen M, Brixen K, Van Hul W. Genetic Screening of WNT4 and WNT5B in Two Populations with Deviating Bone Mineral Densities. *Calcif Tissue Int*. 2017;100:244-249.

Hong AR, Kim JH, Lee JH, Kim SW, Shin CS. Metabolic characteristics of subjects with spine-femur bone mineral density discordances: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES 2008-2011). *J Bone Miner Metab*. 2019;37:835-843.

Hu Z, Yang K, Hu Z, Li M, Wei H, Tang Z, Chen B, Su C, Cai D, Xu J. Determining the association between hypertension and bone metabolism markers in osteoporotic patients. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100:e26276.

Huaman O, Bahamonde J, Cahuascano B, Jervis M, Palomino J, Torres CG, Peralta OA. Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue. *Res Vet Sci*. 2019;124:212-222.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2019. 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101748.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2022.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 10th Edition. 2021. Disponível em: https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf. Acesso em: 08 jul. 2022.

International Osteoporosis Foundation. IOF Compendium of Osteoporosis Second Edition. 2019. Disponível em: <https://www.osteoporosis.foundation/sites/iofbonehealth/files/2020-01/IOF-Compendium-of-Osteoporosis-web-V02.pdf>. Acesso em 08 jul. 2022.

Itasaki N, Hoppler S. Crosstalk between Wnt and bone morphogenic protein signaling: a turbulent relationship. *Dev Dyn*. 2010;239:16-33.

Iwamoto J, Seki A. Effect of Combined Teriparatide and Monthly Risedronate Therapy on Cancellous Bone Mass in Orchidectomized Rats: A Bone Histomorphometry Study. *Calcif Tissue Int*. 2015;97:23-31.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int*. 1985;37:605-607.

Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. 2007;166:495-505.

Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. *J Periodontol*. 2009;80:1719-1730.

Jiang X. On novel options for oromaxillofacial functional restoration. *Int J Prosthodont*. 2012;25:132-134.

Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Prolif*. 2021;54:e12956.

Johnson RB, Thliveris JA. Effect of low-protein diet on alveolar bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontol*. 1989;60:264-270.

Junior AG, Dos Reis Lívero FA. Cell-based Therapy for Hypertension: Challenges and Perspectives. *Curr Pharm Des*. 2018;24:3084-3089.

Kalaitzoglou E, Popescu I, Bunn RC, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14:310-319.

Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:153-163.

Kato M, Kato M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4042-4035.

Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2015;16:239-253.

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

Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K, Zhou C, Chou J, Parkman VA, Novick SJ, Strutzenberg TS, Pascal BD, Le PT, Brooks DJ, Roche AM, Gerber KK, Mattheis L, Chen W, Tu H, Bouxsein ML, Griffin PR, Baron R, Rosen CJ, Bonewald LF, Spiegelman BM. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via αV Integrin Receptors. *Cell*. 2018;175:1756-1768.e17. Erratum in: *Cell*. 2019;178:507-508.

Kim JH, Lee DE, Choi SH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Diabetic characteristics and alveolar bone loss in streptozotocin- and streptozotocin-nicotinamide-treated rats with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2014;49:792-800.

Kim N, Cho SG. New strategies for overcoming limitations of mesenchymal stem cell-based immune modulation. *Int J Stem Cells.* 2015;8:54-68.

Krahe C. Perimenopausa, massa óssea e o risco de fraturas. *Femina.* 2003;31:327-331.

Kushwaha P, Kim S, Foxa GE, Michalski MN, Williams BO, Tomlinson RE, Riddle RC. Frizzled-4 is required for normal bone acquisition despite compensation by Frizzled-8. *J Cell Physiol.* 2020;235:6673-6683.

Landim de Barros T, Brito VG, do Amaral CC, Chaves-Neto AH, Campanelli AP, Oliveira SH. Osteogenic markers are reduced in bone-marrow mesenchymal cells and femoral bone of young spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2016;146:174-183.

Lee RH, Seo MJ, Pulin AA, Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood.* 2009;113:816-826.

Lee TC, Burghardt AJ, Yao W, Lane NE, Majumdar S, Gullberg GT, Seo Y. Improved trabecular bone structure of 20-month-old male spontaneously hypertensive rats. *Calcif Tissue Int.* 2014;95:282-291.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008;58:424-430.

Levinger I, Seeman E, Jerums G, McConell GK, Rybchyn MS, Cassar S, Byrnes E, Selig S, Mason RS, Ebeling PR, Brennan-Speranza TC. Glucose-loading reduces bone remodeling in women and osteoblast function in vitro. *Physiol Rep.* 2016;4:e12700.

Li CJ, Cheng P, Liang MK, Chen YS, Lu Q, Wang JY, Xia ZY, Zhou HD, Cao X, Xie H, Liao EY, Luo XH. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 2015;125:1509-1522.

Li X, Zhou ZY, Zhang YY, Yang HL. IL-6 Contributes to the Defective Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells from the Vertebral Body of the Glucocorticoid-Induced Osteoporotic Mouse. *PLoS One.* 2016;11:e0154677.

Liew A, O'Brien T. The potential of cell-based therapy for diabetes and diabetes-related vascular complications. *Curr Diab Rep.* 2014;14:469.

Liu Q, Yang Z, Xie C, Ling L, Hu H, Cao Y, Huang Y, Zhu Q, Hua Y. The Hyperglycemia and Hyperketonemia Impaired Bone Microstructures: A Pilot Study in Rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:590575.

Liu S, Yang X, Zhong X, Li L, Zhang X. Involvement of miR-337 in high glucose-suppressed osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells via negative regulation of Rap1A. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021;57:350-358.

Liu W, Liu Y, Guo T, Hu C, Luo H, Zhang L, Shi S, Cai T, Ding Y, Jin Y. TCF3, a novel positive regulator of osteogenesis, plays a crucial role in miR-17 modulating the diverse effect of canonical Wnt signaling in different microenvironments. *Cell Death Dis.* 2013;4:e539.

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

Lopes HB, Freitas GP, Elias CN, Tye C, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Rosa AL, Beloti MM. Participation of integrin β 3 in osteoblast differentiation induced by titanium with nano or microtopography. *J Biomed Mater Res A.* 2019;107:1303-1313.

Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, Liu H, Wang T, Ono S, Guo X, Yatsula B, Guo J, Gu Y, Navarro T, Dardik A. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:188.

Louis WJ, Howes LG. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16 Suppl 7:S1-S5.

Lowery JW, Rosen V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev.* 2018;98:2431-2452.

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

Lu Y, Liu YK, Wan FY, Shi S, Tao R. CircSmg5 stimulates the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting the miR-194-5p/Fzd6 axis and beta-catenin signaling. *Environ Toxicol.* 2022;37:593-602.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014;32:1408-1149.

Lyashenko N, Weissenböck M, Sharir A, Erben RG, Minami Y, Hartmann C. Mice lacking the orphan receptor *ror1* have distinct skeletal abnormalities and are growth retarded. *Dev Dyn.* 2010;239:2266-2277.

Maeda Y, Tsuji K, Nifuji A, Noda M. Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation in vivo. *J Cell Biochem.* 2004;93:337-344.

Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:21-34.

Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995;332:305-311.

Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sánchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, Sumida DH, Antoniali C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression

during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Investig.* 2015;19:1319-1327.

Manzari-Tavakoli A, Babajani A, Farjoo MH, Hajinasrollah M, Bahrami S, Niknejad H. The Cross-Talks Among Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Other Prominent Pathways Involved in Neural Differentiation. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:827275.

Marin C, Luyten FP, Van der Schueren B, Kerckhofs G, Vandamme K. The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:6.

Mashimo T, Sato Y, Akita D, Toriumi T, Namaki S, Matsuzaki Y, Yonehara Y, Honda M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance bone marrow regeneration in dental extraction sockets. *J Oral Sci.* 2019;61:284-293.

Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes.* 1998;47:224-229.

Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 2005;11:787-802.

McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem.* 2007;102:1343-1357.

Merrill RM, Weed DL, Feuer EJ. The lifetime risk of developing prostate cancer in white and black men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:763-768.

Meyers CA, Xu J, Asatrian G, Ding C, Shen J, Broderick K, Ting K, Soo C, Peault B, James AW. WISP-1 drives bone formation at the expense of fat formation in human perivascular stem cells. *Sci Rep.* 2018;8:15618.

Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol.* 2019;21:122-132.

Mullin BH, Mamotte C, Prince RL, Spector TD, Dudbridge F, Wilson SG. Conditional testing of multiple variants associated with bone mineral density in the FLNB gene region suggests that they represent a single association signal. *BMC Genet.* 2013;14:107.

Ni LH, Tang RN, Yuan C, Song KY, Wang LT, Wang XC, Zhang YX, Zhang XL, Zhu DD, Liu BC. FK506 prevented bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats via enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis. *Ann Transl Med.* 2019;7:265.

Nickel J, Mueller TD. Specification of BMP Signaling. *Cells.* 2019;8:1579.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-293.

Olsen OE, Wader KF, Hella H, Mylin AK, Turesson I, Nesthus I, Waage A, Sundan A, Holien T. Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal*. 2015;13:27.

Osima M, Kral R, Borgen TT, Høgestøl IK, Joakimsen RM, Eriksen EF, Bjørnerem Å. Women with type 2 diabetes mellitus have lower cortical porosity of the proximal femoral shaft using low-resolution CT than nondiabetic women, and increasing glucose is associated with reduced cortical porosity. *Bone*. 2017;97:252-260.

Panteli M, Pountos I, Jones E, Giannoudis PV. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med*. 2015;19:685-713.

Persson E, Souza PPC, Floriano-Marcelino T, Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Activation of Shc1 Allows Oncostatin M to Induce RANKL and Osteoclast Formation More Effectively Than Leukemia Inhibitory Factor. *Front Immunol*. 2019;10:1164. \

Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. 2009;20:399-408.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.

Qi M, Zhang L, Ma Y, Shuai Y, Li L, Luo K, Liu W, Jin Y. Autophagy Maintains the Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Prevent Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis. *Theranostics*. 2017;7:4498-4516.

Qian C, Zhu C, Yu W, Jiang X, Zhang F. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. *PLoS One*. 2015;10:e0136390.

Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:126-136.

Rodríguez JP, Garat S, Gajardo H, Pino AM, Seitz G. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. *J Cell Biochem*. 1999;75:414-423.

Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem celltherapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J*. 2005;32:339-347.

Samsulrizal N, Goh YM, Ahmad H, Md Dom S, Azmi NS, NoorMohamad Zin NS, Ebrahimi M. *Ficus deltoidea* promotes bone formation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*. 2021;59:66-73.

Sanfilippo F, Bianchi AE. Osteoporosis: the effect on maxillary bone resorption and therapeutic possibilities by means of implant prostheses--a literature review and clinical considerations. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23:447-457.

Schubert W, Sotgia F, Cohen AW, Capozza F, Bonuccelli G, Bruno C, Minetti C, Bonilla E, Dimauro S, Lisanti MP. Caveolin-1(-/-)- and caveolin-2(-/-)-deficient mice both display numerous skeletal muscle abnormalities, with tubular aggregate formation. *Am J Pathol.* 2007;170:316-333.

Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation.* 2009;87:S49-S53.

Shao J, Zhang W, Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biol Res.* 2015;48:62.

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

Silva JC, Sampaio P, Fernandes MH, Gomes PS. The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes. *J Cell Biochem.* 2015;116:1658-1667.

Simpson LL. The effect of prostaglandin E2 on the arterial blood pressure of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1974;51:559-564.

Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics.* 2011;11:691-708.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2022. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br>. Acesso em: 08 jul. 2022.

Song J, Ye B, Liu H, Bi R, Zhang N, Hu J, Luo E. Fak-Mapk, Hippo and Wnt signalling pathway expression and regulation in distraction osteogenesis. *Cell Prolif.* 2018;51:e12453.

Sortwell CE, Pitzer MR, Collier TJ. Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: implications for improving grafted dopamine neuron survival. *Exp Neurol.* 2000;165:268-277.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. *Cytotherapy.* 2018;20:1267-1277.

Souza ATP, Lopes HB, Freitas GP, Ferraz EP, Oliveira FS, Almeida ALG, Weffort D, Beloti MM, Rosa AL. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Metab.* 2020;38:481-490.

Stalvey MS, Havasi V, Tuggle KL, Wang D, Birket S, Rowe SM, Sorscher EJ. Reduced bone length, growth plate thickness, bone content, and IGF-I as a model for poor growth in the CFTR-deficient rat. *PLoS One.* 2017;12:e0188497.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33:919-926.

Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2010;191:453-465.

Strojny W, Kwiecińska K, Fijorek K, Korostyński M, Piechota M, Balwierz W, Skoczeń S. Comparison of blood pressure values and expression of genes associated with hypertension in children before and after hematopoietic cell transplantation. *Sci Rep*. 2021;11:9303.

Su P, Tian Y, Yin C, Wang X, Li D, Yang C, Pei J, Deng X, King S, Li Y, Qian A. MACF1 promotes osteoblastic cell migration by regulating MAP1B through the GSK3beta/TCF7 pathway. *Bone*. 2022;154:116238.

Sui B, Hu C, Liao L, Chen Y, Zhang X, Fu X, Zheng C, Li M, Wu L, Zhao X, Jin Y. Mesenchymal progenitors in osteopenias of diverse pathologies: differential characteristics in the common shift from osteoblastogenesis to adipogenesis. *Sci Rep*. 2016;6:30186.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50:537-546.

Szychlińska MA, Stoddart MJ, D'Amora U, Ambrosio L, Alini M, Musumeci G. Mesenchymal Stem Cell-Based Cartilage Regeneration Approach and Cell Senescence: Can We Manipulate Cell Aging and Function? *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23:529-539.

Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru*. 2017;25:2.

Tang CY, Wu M, Zhao D, Edwards D, McVicar A, Luo Y, Zhu G, Wang Y, Zhou HD, Chen W, Li YP. Runx1 is a central regulator of osteogenesis for bone homeostasis by orchestrating BMP and WNT signaling pathways. *PLoS Genet*. 2021;17:e1009233.

Tiyasatkulkovit W, Promruk W, Rojviriyā C, Pakawanit P, Chaimongkolnukul K, Kengkoom K, Teerapornpantakit J, Panupinthu N, Charoenphandhu N. Impairment of bone microstructure and upregulation of osteoclastogenic markers in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep*. 2019;9:12293.

Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2001;14:704-707.

van de Vyver M. Intrinsic Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus: Implications for Autologous Cell Therapy. *Stem Cells Dev*. 2017;26:1042-1053.

Verhaeghe J, Suiker AM, Nyomba BL, Visser WJ, Einhorn TA, Dequeker J, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. II. Impaired bone turnover and decreased osteocalcin synthesis. *Endocrinology*. 1989;124:573-582.

- Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif Tissue Int.* 2009;84:103-111.
- Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007;18:427-444.
- Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 2010;19:279-289.
- Vilahur G, Nguyen PH, Badimon L. Impact of Diabetes Mellitus on the Potential of Autologous Stem Cells and Stem Cell-Derived Microvesicles to Repair the Ischemic Heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2021. Epub ahead of print.
- von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig.* 2001;5:71-82.
- Wang C, Fei Y, Xu C, Zhao Y, Pan Y. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate neurological deficits and blood-brain barrier dysfunction after intracerebral hemorrhage in spontaneously hypertensive rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:4715-4724.
- Wang C, Liao H, Cao Z. Role of Osterix and MicroRNAs in Bone Formation and Tooth Development. *Med Sci Monit.* 2016;22:2934-2942.
- Wang L, Zhao Y, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu C, Jin Y, Shi S. IFN- γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF κ B signaling. *Stem Cells.* 2013;31:1383-1395.
- Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner.* 1993;20:251-264.
- Wang W, Zhang X, Zheng J, Yang J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem.* 2010;338:115-122.
- Wang X, Zheng L, Zeng Z, Zhou G, Chien J, Qian C, Vasmatazis G, Shridhar V, Chen L, Liu W. DIXDC1 isoform, I-DIXDC1, is a novel filamentous actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347:22-30.
- Wang Y, Tian M, Wang F, Heng BC, Zhou J, Cai Z, Liu H. Understanding the Immunological Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic Transplantation: From the Aspect of Major Histocompatibility Complex Class I. *Stem Cells Dev.* 2019;28:1141-1150.
- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association

Task Force on Clinical Practice Guidelines. Hypertension. 2018;71:e13-e115. Erratum in: Hypertension. 2018;71:e140-e144.

Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. World J Diabetes. 2011;2:41-48.

World Health Organization. Hypertension. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. Acesso em: 08 jul. 2022.

World heart federation. World heart federation roadmap for hypertension – update. 2022. Disponível em: <https://world-heart-federation.org/cvd-roadmaps/wp-content/uploads/sites/3/2021/09/WHF-Hypertension-Roadmap-Summary.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2022.

Wu T, Yao Z, Tao G, Lou F, Tang H, Gao Y, Yang X, Xiao J. Role of Fzd6 in Regulating the Osteogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells in Osteoporotic Mice. Stem Cell Rev Rep. 2021;17:1889-1904.

Yan Q, Gao H, Yao Q, Ling K, Xiao G. Loss of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 gamma (Pip5k1c) in mesenchymal stem cells leads to osteopenia by impairing bone remodeling. J Biol Chem. 2022;298:101639.

Yan Y, Tang D, Chen M, Huang J, Xie R, Jonason JH, Tan X, Hou W, Reynolds D, Hsu W, Harris SE, Puzas JE, Awad H, O'Keefe RJ, Boyce BF, Chen D. Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. J Cell Sci. 2009;122:3566-2578.

Yang YK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. Stem Cell Res Ther. 2018;9:131.

Yang ZX, Han ZB, Ji YR, Wang YW, Liang L, Chi Y, Yang SG, Li LN, Luo WF, Li JP, Chen DD, Du WJ, Cao XC, Zhuo GS, Wang T, Han ZC. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. PLoS One. 2013;8:e59354.

Yaturu S. Diabetes and skeletal health. J Diabetes. 2009;1:246-254.

Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:5062-5067.

Yu C, Wu D, Zhao C, Wu C. CircRNA TGFBR2/MiR-25-3p/TWIST1 axis regulates osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells. J Bone Miner Metab. 2021;39:360-371.

Yu X, Zeng Y, Bao M, Wen J, Zhu G, Cao C, He X, Li L. Low-magnitude vibration induces osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via miR-378a-3p/Grb2 pathway to promote bone formation in a rat model of age-related bone loss. FASEB J. 2020;34:11754-11771.

- Yuan C, Gou X, Deng J, Dong Z, Ye P, Hu Z. FAK and BMP-9 synergistically trigger osteogenic differentiation and bone formation of adipose derived stem cells through enhancing Wnt- β -catenin signaling. *Biomed Pharmacother.* 2018;105:753-757.
- Zaher W, Harkness L, Jafari A, Kassem M. An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. *Arch Toxicol.* 2014;88:1069-1082.
- Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL. *Experimental Endocrinology - a sourcebook of basic techniques.* New York: Academic Press. 1964;136-137.
- Zhang F, Song J, Zhang H, Huang E, Song D, Tollemar V, Wang J, Wang J, Mohammed M, Wei Q, Fan J, Liao J, Zou Y, Liu F, Hu X, Qu X, Chen L, Yu X, Luu HH, Lee MJ, He TC, Ji P. Wnt and BMP Signaling Crosstalk in Regulating Dental Stem Cells: Implications in Dental Tissue Engineering. *Genes Dis.* 2016;3:263-276.
- Zhang H, Gan L, Zhu X, Wang J, Han L, Cheng P, Jing D, Zhang X, Shan Q. Moderate-intensity 4mT static magnetic fields prevent bone architectural deterioration and strength reduction by stimulating bone formation in streptozotocin-treated diabetic rats. *Bone.* 2018;107:36-44.
- Zhao YF, Zeng DL, Xia LG, Zhang SM, Xu LY, Jiang XQ, Zhang FQ. Osteogenic potential of bone marrow stromal cells derived from streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Med.* 2013;31:614-620.
- Zura R, Della Rocca GJ, Mehta S, Harrison A, Brodie C, Jones J, Steen RG. Treatment of chronic (>1 year) fracture nonunion: heal rate in a cohort of 767 patients treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). *Injury.* 2015;46:2036-2041.
- .

ANEXOS

ANEXO A

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
--	---

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que a proposta intitulada "Terapia Celular: Potencial de Células-Tronco Mesenquimais, VEGF-A e BMP-9 para Regenerar Tecido Ósseo", registrada com o nº 2018.1.30.58.8, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 21/03/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/04/2018 a 01/02/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar Hannover Rato heterogênico Wistar Hannover Rato isogênico SHR-NTac
Nº de animais	1310 / 60 / 12
Peso/Idade	150 g / 4 semanas 250 g / 8 semanas 250 g / 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP / Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP)

Ribeirão Preto, 21 de março de 2018.


Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho
 Vice-Coordenador no exercício da Coordenação da
 Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA - FORP/USP

ANEXO B

Produção científica obtida durante a realização do doutorado:

1. Artigos publicados em periódicos

Bighetti-Trevisan RL, **Souza ATP**, Tosin IW, Bueno NP, Crovace MC, Beloti MM, Rosa AL, Ferraz EP. Bioactive glass-ceramic for bone tissue engineering: an in vitro and in vivo study focusing on osteoclasts. *Braz Oral Res.* 2022;36:e022.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Gomes MPO, Quiles GK, Gordon J, Tye C, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 by CRISPR-Cas9 present high in vitro osteogenic potential and enhance in vivo bone formation. *Gene Ther.* 2021;28:748-759.

Souza ATP, Lopes HB, Oliveira FS, Weffort D, Freitas GP, Adolpho LF, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. The extracellular matrix protein Agrin is expressed by osteoblasts and contributes to their differentiation. *Cell Tissue Res.* 2021;386:335-347.

Abuna RPF, Almeida LO, **Souza ATP**, Fernandes RR, Sverzut TFV, Rosa AL, Beloti MM. Osteoporosis and osteoblasts cocultured with adipocytes inhibit osteoblast differentiation by downregulating histone acetylation. *J Cell Physiol.* 2021;236:3906-3917.

Lopes HB, **Souza ATP**, Freitas GP, Elias CN, Rosa AL, Beloti MM. Effect of focal adhesion kinase inhibition on osteoblastic cells grown on titanium with different topographies. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190156.

Souza ATP, Lopes HB, Freitas GP, Ferraz EP, Oliveira FS, Almeida ALG, Weffort D, Beloti MM, Rosa AL. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Metab.* 2020;38:481-490.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Totoli GGC, Tarone AG, Marostica-Junior MR, Rosa AL, Beloti MM. Jabuticaba peel extract modulates adipocyte and osteoblast differentiation of MSCs from healthy and osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab.* 2021;39:163-173.

Freitas GP, **Souza ATP**, Lopes HB, Trevisan RLB, Oliveira FS, Fernandes RR, Ferreira FU, Ros FA, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue: Isolation, Culture, Characterization and Differentiation. *Bio Protoc.* 2020;10:e3534.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Souza LEB, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Cell Therapy: Effect of Locally Injected Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow or Adipose Tissue on Bone Regeneration of Rat Calvarial Defects. *Sci Rep.* 2019;9:13476.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Coelho PG, Ferreira FU, Covas DT, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with osteoblasts

differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. *Regen Med.* 2019;14:1107-1119.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. *Cytherapy.* 2018;20:1267-1277.

Abuna RPF, Oliveira FS, Ramos JIR, Lopes HB, Freitas GP, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in rat osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2018;234:749-756.

Souza ATP, Bezerra BLS, Oliveira FS, Freitas GP, Bighetti Trevisan RL, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. *J Cell Biochem.* 2018;119:8441-8449.

2. Resumos publicados em anais de congressos

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Weffort D, Adolpho LF, Oliveira FS, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of hypertension on osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells and bone repair. 49th European Calcified Tissue Society Congress. *Bone Reports: Abstracts of the ECTS 2022 Congress*, 2022. v. 16S. p. 4-5.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Weffort D, Adolpho LF, Oliveira FS, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of the interaction between cells from healthy and osteoporotic rats on osteoblast differentiation and bone repair. 49th European Calcified Tissue Society Congress. *Bone Reports: Abstracts of the ECTS 2022 Congress*, 2022. v. 16S. p. 5-6.

Souza ATP, Oliveira FS, Weffort D, Lopes HB, Freitas GP, Gomes MPO, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. Agrin drives osteoblast differentiation through Wnt and BMP signaling modulation. 2020 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Virtual Event. *Journal of Bone and Mineral Research Supplement 1 Abstracts 2020*. p. 180-180.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Weffort D, Oliveira FS, Adolpho LF, Beloti MM, Rosa AL. Effects of mesenchymal stromal cells from healthy rats on the impaired osteoblast differentiation of mesenchymal stromal cells from osteoporotic and diabetic rats. 2020 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Virtual Event. *Journal of Bone and Mineral Research Supplement 1 Abstracts 2020*. p. 181-181.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Positive effects of mesenchymal stem cells from healthy rats on the impaired osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells from osteoporotic and diabetic rats. 47th European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2020 Digital Congress). *Bone Reports: Abstracts of the ECTS Congress 2020*, v. 13S. p. 28-28.

Souza ATP, Almeida ALG, Freitas GP, Lopes HB, Gimenes R, Siessere S, Sousa LG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of Polymer/Ceramic Membrane Associated with Mesenchymal Stem Cells on Bone Repair in Osteoporotic Rats. Society for Biomaterials Annual Meeting & Exposition 2019. p. 672-672.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Almeida ALG, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Effect of cell therapy with osteoblasts from different sources on bone repair of rat calvaria defects. 24th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2019. v. 48. p. 33-33.

Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Ferraz EP, Oliveira FS, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Efeito da terapia celular com osteoblastos no reparo ósseo. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research, 2018. v. 32. p. 330-330.

3. Resumos publicados em anais de congressos (coautoria)

Gomes MPO, **Souza ATP**, Adolpho LF, Lopes HB, Freitas GP, Rosa AL, Beloti MM. Agrin overexpression enhances osteoblast differentiation of immortalized mesenchymal stromal Cells. 25th Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. 2022 ASGCT Annual Meeting. Molecular Therapy Supplement 1 Abstracts 2022. p. 183-183.

Freitas GP, **Souza ATP**, Lopes HB, Weffort D, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Efeitos de células-tronco de ratos saudáveis sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco de ratos hipertensos. 38th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2021. p. 43-43.

Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira FS, Weffort D, Freitas GP, Adolpho LF, Rosa AL, Beloti, MM. Efeito de agrin na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais. 38th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2021. p. 44-44.

Kadooka MY, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Imortalização de Células-tronco Mesenquimais Derivadas de Medula Óssea de Ratos. 38th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2021. p. 98-98.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Santos IC, Almeida ALG, Tye C, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Beloti MM, Rosa AL. Mesenchymal stemcells overexpressing BMP9 through CRISPR-Cas9 activation increase bone formation in rat calvarial defects. 47th European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2020 Digital Congress). Bone Reports: Abstracts of the ECTS Congress 2020, v. 13S. p. 6-6.

Abuna RPF, Almeida LO, **Souza ATP**, Fernandes RR, Sverzut TFV, Scaf B, Lima J, Rosa AL, Beloti MM. Adipocytes and osteoporosis inhibit osteoblast differentiation by downregulating histone acetylation. 47th European Calcified Tissue Society Congress (ECTS 2020 Digital Congress). Bone Reports: Abstracts of the ECTS Congress 2020, v. 13S. p. 27-28.

Santos IC, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Células-tronco mesenquimais sobre-expressando proteína morfogenética óssea 9 por CRISPR-

Cas9 aumentam o reparo de defeitos ósseos críticos. 42ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 2020. v. 36. p. 38-38.

Gomes MPO, **Souza ATP**, Lopes HB, Oliveira FS, Weffort D, Freitas GP, Fernandes RR, Beloti MM, Rosa AL. Participação da proteína agrin na diferenciação osteoblástica. 42ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 2020. v. 36. p. 21-21.

Barbosa ACL, Otavio SG, Freitas GP, **Souza ATP**, Tarone AG, Marostica Junior MR, Rosa AL, Beloti MM. Efeito do extrato da casca da jabuticaba no potencial osteogênico e adipogênico de células-tronco mesenquimais de ratos osteoporóticos. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. p. 57-57.

Totoli GGC, **Souza ATP**, Freitas GP, Lopes HB, Weffort D, Adolpho LF, Beloti MM, Rosa AL. Células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis aumentam o potencial osteogênico de células-tronco de ratos diabéticos. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 58-58.

Adolpho LF, Souza PG, Lopes HB, **Souza ATP**, Weffort D, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. Participação das vias de sinalização Hedgehog e Notch na diferenciação osteoblástica. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 68-68.

Weffort D, Pitol Palin L, **Souza ATP**, Adolpho LF, Freitas GP, Beloti MM, Okamoto R, Rosa AL. Efeito da diabetes mellitus tipo 2 nos processos de proliferação e diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 69-69.

Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira FS, Weffort D, Freitas GP, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. A proteína Agrin regula a diferenciação osteoblástica através da modulação das vias Wnt e BMP. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 90-90.

Souza PG, Abuna RPF, Almeida LO, **Souza ATP**, Fernandes RR, Sverzut TFV, Rosa AL, Beloti MM. Osteoporose e osteoblastos cocultivados com adipócitos inibem a osteogênese pela regulação da acetilação de histona. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 90-90.

Quiles GK, **Souza ATP**, Freitas GP, Lopes HB, Weffort D, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Células-tronco mesenquimais de ratos saudáveis aumentam o potencial osteogênico de células-tronco de ratos osteoporóticos. 37th SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2020. v. 34. p. 174-174.

Freitas GP, Santos IC, Lopes HB, **Souza ATP**, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Células-tronco mesenquimais com sobre-expressão de BMP-9 aumentam a formação óssea em defeitos de calvária de ratos. SBPqO Virtual Annual Meeting. Brazilian Oral research 2020. v. 34. p. 279-279.

Santos IC, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Uso da tecnologia CRISPR-Cas9 para sobre-expressar BMP-9 aumenta o potencial osteogênico in vitro e in vivo de células-tronco mesenquimais. Congresso

Odontológico da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Revista de Odontologia da UNESP 2020. v. 49. p. 36-36.

Lopes HB, Biguetti-Trevisan RL, Poker BC, Castro-Raucci LM, Ferraz EP, **Souza ATP**, Freitas GP, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with nanotopography induces osteoblast and inhibits osteoclast differentiation. 46th European Calcified Tissue Society Congress. Calcif Tissue Int. New Data Abstracts of the ECTS Congress 2019. v. 104. p. S154-S154.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Almeida AL, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of locally injected mesenchymal stem cells on bone regeneration of rat calvaria defects. ICTERMA: International Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications, 2019.

Lopes HB, Biguetti-Trevisan RL, Poker BC, Castro-Raucci LM, Ferraz EP, **Souza ATP**, Freitas GP, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with Nanotopography Induces Osteoblast and Inhibits Osteoclast Differentiation. Society for Biomaterials Annual Meeting & Exposition 2019. p. 81-81.

Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Almeida ALG, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of local injection of osteoblastic cells differentiated from bone marrow or adipose tissue-mesenchymal stromal cells on bone repair. 46th European Calcified Tissue Society Congress. Calcif Tissue Int. New Data Abstracts of the ECTS Congress 2019. v. 104. p. S156-S157.

Quiles GK, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Avaliação do osso neoformado por injeções locais de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e tecido adiposo em defeitos ósseos. 41ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 2019. v. 35. p. 21-21.

Gomes MPO, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Avaliação do potencial osteogênico de células-tronco mesenquimais modificadas geneticamente pelo sistema CRISPR-Cas9 para sobre-expressar BMP-9. 41ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 2019. v. 35. p. 38-38.

Santos IC, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Potencial de células-tronco mesenquimais geneticamente editadas pelo sistema CRISPR/Cas9 para sobre-expressar BMP-9 na formação óssea in vivo. 41ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto. Anais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo 2019. v. 35. p. 43-43.

Adolpho LF, Lopes HB, **Souza ATP**, Freitas GP, Elias CN, Rosa AL, Beloti MM. Efeito da inibição da quinase de adesão focal em osteoblastos crescidos sobre titânio com diferentes topografias. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 58-58.

Weffort D, **Souza ATP**, Lopes HB, Freitas GP, Ferraz EP, Almeida ALG, Beloti MM, Rosa AL. Efeito da origem embrionária de osteoblastos no potencial osteogênico in

vitro e na capacidade de formação óssea in vivo. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 58-58.

Totoli GGC, Freitas GP, Lopes HB, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Efeito da terapia celular com osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo no reparo ósseo. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 59-59.

Copete IN, Bueno NP, **Souza ATP**, Marques MM, Miniello TG, Ferraz EP. Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de ratos diabéticos. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 92-92.

Gomes MPO, Lima J, Lopes HB, Freitas GP, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Efeitos angiogênico e osteogênico da BMP-9 em células-tronco mesenquimais de medula óssea e do tecido adiposo. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 93-93.

Lopes GO, **Souza ATP**, Angelica RS, Pereira Neto ARL, Lima RR. Alterações microestruturais do osso alveolar de ratos expostos cronicamente ao metilmercúrio. 36th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2019. v. 33. p. 341-341.

Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, **Souza ATP**, Oliveira PGFP, Coelho PG, Beloti MM, Rosa AL. Effect of Local Injections of Mesenchymal Stem Cells and Osteoblasts derived from bone marrow on Bone Regeneration. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 41-41.

Abuna RPF, Oliveira FS, Ramos JIR, Lopes HB, Freitas GP, **Souza ATP**, Beloti MM, Rosa AL. Seleção de genes de referência para reações em cadeia da polimerase em tempo real para estudos de osteoblastos de ratos. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 55-55.

Ortiz AC, Fideles SOM, **Souza ATP**, Passos GAS, Gomes OS, Fernandes MH, Beloti MM, Rosa AL. Influência da diabetes mellitus na expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 61-61.

Luquete Junior ES, **Souza ATP**, Fernandes RR, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL, Ferraz EP. Efeito da Proteína Recombinante Wnt-3a sobre a Diferenciação Osteoblástica. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 92-92.

Weffort D, **Souza ATP**, Oliveira FS, Beloti MM, Rosa AL. Expressão gênica de agrin durante a diferenciação osteoblástica de células da linhagem MC3T3-E1. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 92-92.

Poker BC, Bigueti-Trevisan RL, Castro-Raucci LMS, Ferraz EP, **Souza ATP**, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Efeito do titânio com nanotopografia sobre proliferação e diferenciação osteoclástica de células da linhagem RAW 264.7. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 138-138.

Lima J, **Souza ATP**, Sousa LG, Rosa AL, Beloti MM. Efeito de células-tronco de ratos saudáveis sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco de ratos osteoporóticos. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 160-160.

Bezerra BLS, **Souza ATP**, Freitas GP, Oliveira FS, Biguetti-Trevisan RL, Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Papel da proteína óssea morfogenética 9 na interação entre osteoblastos e superfície de titânio com nanotopografia. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 161-161

Biguetti-Trevisan RL, Tosin IW, **Souza ATP**, Crovace M, Rosa AL, Ferraz EP. Efeito do BioS-2P sobre a Expressão de Genes Relacionados à Remodelação Óssea. 35th SBPqO Annual Meeting. Brazilian Oral Research 2018. v. 32. p. 325-325.

4. Realização de Estágio no Exterior

Harvard University, EUA.

Harvard School of Dental Medicine.

Division of Bone and Mineral Research.

Department of Oral Medicine, Infection and Immunity.

Baron-Gori Lab.

Período: 01/10/2019 à 31/01/2021.

Bolsas Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) FAPESP: Processo nº 2019/08048-9 de 01/10/2019 à 30/09/2020 e Harvard University de 01/10/2020 à 31/01/2021.

Supervisor: Prof. Dr. Roland Baron.

Título do projeto: Zinc finger protein 467 in osteocytes: regulation by parathyroid hormone and effect on skeletal homeostasis.