



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

JÉSSICA EMANUELLA ROCHA MOURA PAZ

Efeitos da Hipóxia em células-tronco mesenquimais sobre-expressando BMP-9

PG.PErio
FOMP-USP

Ribeirão Preto

2023

JÉSSICA EMANUELLA ROCHA MOURA PAZ

Efeitos da Hipóxia em células-tronco mesenquimais sobre-expressando BMP-9

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2023

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

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Paz, Jéssica Emanuella Rocha Moura

Efeitos da Hipóxia em células-tronco mesenquimais sobre-expressando BMP-9. Ribeirão Preto, 2023.

97p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. Hipóxia; 2. Célula-tronco; 3. Osso; 4. Osteoblasto; 5. BMP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAZ, JÉRM. **Efeitos da Hipóxia em células-tronco mesenquimais sobre-expressando BMP-9**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular, de Histologia, LAB 3D BIO, no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) na modalidade Bolsa de Mestrado, Código de Financiamento 001, do conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2017/12622-7).

“Não existe nada impossível, existe apenas aquilo que não foi desejado com a força que deveria para ser realizado. Tudo começa dentro de você.”

- Abraham Hicks-

Dedicatória

Para **Carla** e **Valmir**, com amor.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Carla Patrícia Rocha Paz e **Valmir
Francisco da Paz**, por todo apoio e
amor incondicional.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por estar presente em mim e me proporcionar a oportunidade de experienciar, crescer e evoluir nesta vida.

Mais uma vez, agradecer aos meus pais **Valmir Francisco da Paz** e **Carla Patrícia Rocha Paz** por todo amor, dedicação e apoio, por estarem presentes em todas as etapas de crescimento da minha vida e não pouparem esforços para que eu realize todos os meus sonhos.

Ao meu marido, **Lucas Moura Sousa**, por ser para mim um exemplo de dedicação, esforço e competência, pelo companheirismo e amizade. Sou extremamente grata por poder compartilhar essa vida ao seu lado, seu amor foi essencial para que eu chegasse até aqui. Amo você imensamente.

Ao meu irmão, **Jefferson Ellan** e à minha cunhada e irmã, **Imayra Zuilla** por estarem sempre presentes me transmitindo afeto e carinho, apoiando e incentivando todos os projetos da minha vida.

A toda minha família e amigos, por acreditarem no meu trabalho e sempre me apoiarem, independente do tempo e da distância. Em especial, aos meus avós **Darby Rocha**, **Ribamar Francisco** e **Maria de Jesus** (*in memoriam*), sei que estão sempre comigo, guiando e iluminando todos os meus caminhos. À minha vó **Maria Vicencia**, por ser para mim um balsamo de amor e carinho, um exemplo de força.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa** por toda confiança a mim depositada. Obrigada por ter me recebido, pela paciência e dedicação ao meu trabalho, por todas as oportunidades de aprendizado e pela grande contribuição com a minha formação profissional. O senhor é um grande exemplo para mim. Fica aqui registrado o meu mais profundo e sincero agradecimento.

Aos demais professores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto FORP-USP, em especial ao **Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti**, por ser um pesquisador admirável, um exemplo de gentileza, cordialidade e competência. Sou extremamente grata por toda experiência e conhecimento compartilhando.

À **Jaqueline Ramos** por todo o trabalho e dedicação com a minha pesquisa, mas principalmente por todo apoio, parceria e companheirismo em todos os momentos, desde a residência até o mestrado. Sua amizade foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos amigos, **Giselle Silva e Marco Aurélio** (*in memoriam*), por cada momento bom que compartilhamos juntos. Tivemos a oportunidade de comemorar muitos momentos de alegria e vitórias, tenho certeza que agora não está sendo diferente.

Aos meus colegas de pós-graduação e de laboratório **Rayana Bighetti, Robson Diego Calixto, Gileade Freitas, Helena Bacha Lopes, Alann Thaffarell, Marcelle Beathriz, Gabriela Guaraldo, Letícia Adolpho, Denise Weffort, Paola Gomes, Maria Paula, Georgia Kors, Ana Patrícia, Antônio Secco, Carol Coelho, José Bernardo, Thaís Moré, Lucas Dias, João Lisboa** e aos alunos de iniciação científica. Agradeço pela convivência diária, por toda a ajuda e experiências compartilhadas durante minha passagem no *Bone Research Lab*.

Aos técnicos, **Fabíola Singaretti, Adriana de Almeida, Roger e Milla** por todo o conhecimento compartilhado. À **Fabíola**, pela paciência, ajuda e orientação na execução de todas as etapas desse trabalho e que muito além do grande conhecimento e competência, é como se fosse uma mãe extremamente amorosa, sou muito grata por todo apoio e carinho a mim dedicado. À **Adriana** pela amizade, carinho e por todo o seu generoso auxílio e contribuição com o meu trabalho. Obrigada por estarem sempre comigo.

A todos os professores que fazem ou fizeram parte da minha formação, aos professores do **Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Universidade Federal do Ceará – HUWC/UFC**, deixo registrado o meu apreço por essa instituição e por todos os professores que contribuíram com meu crescimento profissional.

Às funcionárias do departamento, **Maria Isabel, Aparecida Dulce e Carla Daniela**, por todo serviço prestado no decorrer desses anos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos Funcionários FORP-USP, recepção, portaria, limpeza, manutenção, secretaria, clínicas, laboratórios, vigilância, biotério entre outros departamentos, por manter operante a faculdade, sempre como sinônimo de qualidade, proporcionando atendimento de referência à população e exemplo de formação profissional.

A todos os animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa, principalmente as quais estive envolvida, meu sincero respeito e gratidão.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento utilizado nesta pesquisa (projeto FAPESP número: 2017 /12622-7).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Muito Obrigada.

Resumo

RESUMO

PAZ, JÉRM. **Efeitos da Hipóxia em células-tronco mesenquimais sobre-expressando BMP-9**. 2023. 970p. Dissertação (Mestrado em Odontologia (Periodontia)) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea, do tecido adiposo e do ligamento periodontal, e MSCs diferenciadas em osteoblastos para promover o reparo ósseo, esses estudos tem mostrado significativa formação óssea em defeitos tratados com os diferentes tipos celulares utilizados quando comparados com defeitos não tratados. Embora esses resultados sejam promissores e comprovem a eficácia da terapia celular, a completa regeneração óssea ainda não foi observada, a despeito do uso de MSCs que sobre-expressam BMP-9 (MSCs^{BMP-9+}). Nesse contexto, é relevante avaliar se o condicionamento de MSCs^{BMP-9+} por Hipóxia aumentaria seu potencial terapêutico na regeneração óssea. Nossas hipóteses são que a Hipóxia regula a expressão de componentes e alvos da via de sinalização de BMPs em MSCs^{BMP-9+} e que o secretoma dessas células cultivadas sob Hipóxia aumenta a migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos, as células que participam mais ativamente do processo de regeneração óssea. Inicialmente foi realizado a padronização para indução de Hipóxia onde MSCs^{BMP-9+} foram tratadas com o mimetizador químico de Hipóxia cloreto de cobalto (CoCl₂) e avaliado o efeito dose-resposta e a expressão de HIF-1 α e seus alvos *Glu1* e *Vegfa*, avaliação do efeito da Hipóxia sobre os componentes e alvos da via de sinalização de BMP e os efeitos do secretoma, contido no meio condicionado de MSCs^{BMP-9+} sob Hipóxia (MC Hipóxia) na viabilidade, migração celular e na diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos. Os resultados demonstraram que as concentrações maiores que 100 μ M de CoCl₂ reduziram a viabilidade em todos os períodos avaliados ($p < 0,001$). A Hipóxia induzida por 40 μ M de CoCl₂ nos últimos 3 dias não afetou a viabilidade celular de MSCs^{BMP-9+}, resultou em maior expressão proteica de HIF-1 α e 4 h após a remoção da Hipóxia ainda pode ser observado um aumento da expressão gênica de *Glu1* e *Vegfa* quando comparada ao Controle. A Hipóxia não afetou a expressão proteica de BMP-9 e a expressão gênica de *Bmp-4*, *Smad5* e *Runx2*, mas regulou positivamente a expressão gênica de *Bmp-2*, *Bmpr1a*, *Smad1* e *Hey1*. O MC Hipóxia não afetou a viabilidade celular de MSCs e de osteoblastos em todos os períodos avaliados, mas aumentou a migração de MSCs e de osteoblastos, bem como aumentou a diferenciação osteoblástica como revelado pela expressão das proteínas RUNX2 e ALP, sem afetar a atividade de ALP em MSCs e osteoblastos. Nossos dados indicam que a Hipóxia regula a via de sinalização de BMP em MSCs^{BMP-9+} e que o MC derivado dessas células cultivadas em condições de Hipóxia aumenta a migração celular e a diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos. O uso de MC ou moléculas secretadas por MSCs sobre-expressando BMP-9 cultivadas sob Hipóxia têm potencial para aumentar a formação óssea.

Palavras-chave: Hipóxia. Células-tronco. Osso. Osteoblasto. BMP.

Abstract

ABSTRACT

PAZ, JERM. **Effects of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cells Overexpressing BMP-9.** 2023. 97p Dissertação (Mestrado em Odontologia (Periodontia)) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Our research group has evaluated mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow, adipose tissue and periodontal ligament, and MSCs differentiated into osteoblasts to promote bone repair, and these studies have shown significant bone formation in defects treated with the different cell types used when compared with untreated defects. Although these results are promising and prove the effectiveness of cell therapy, complete bone regeneration has not yet been observed, despite the use of MSCs that overexpress BMP-9 (MSCs^{BMP-9+}). In this context, it is relevant to assess whether the conditioning of MSCs^{BMP-9+} by Hypoxia would increase its therapeutic potential in bone regeneration. Our hypotheses are that Hypoxia regulates the expression of components and targets of the BMPs signaling pathway in MSCs^{BMP-9+} and that the secretome of these cells cultured under Hypoxia increases the migration and osteoblastic differentiation of MSCs and osteoblasts, the cells that most actively participate of the bone regeneration process. Initially, the standardization for Hypoxia induction was carried out where MSCs^{BMP-9+} were treated with the chemical Hypoxia mimic cobalt chloride (CoCl₂) and the dose-response effect and the expression of HIF-1 α and its targets *Glu1* and *Vegfa* were evaluated, evaluation of the effect of Hypoxia on the components and targets of the BMP signaling pathway and the effects of the secretome, contained in the conditioned medium of MSCs^{BMP-9+} under Hypoxia (MC Hypoxia) on the viability, cell migration and osteoblastic differentiation of MSCs and osteoblasts. The results demonstrated that concentrations greater than 100 μ M of CoCl₂ reduced viability in all evaluated periods ($p < 0.001$). Hypoxia induced by 40 μ M CoCl₂ in the last 3 days did not affect the cell viability of MSCs^{BMP-9+}, resulted in higher protein expression of HIF-1 α and 4 h after removal of Hypoxia an increase in gene expression of *Glu1* and *Vegfa* when compared to Control. Hypoxia did not affect BMP-9 protein expression and *Bmp-4*, *Smad5* and *Runx2* gene expression, but upregulated *Bmp-2*, *Bmpr1a*, *Smad1* and *Hey1* gene expression. MC Hypoxia did not affect the cell viability of MSCs and osteoblasts in all periods evaluated, but it increased the migration of MSCs and osteoblasts, as well as increased osteoblastic differentiation as revealed by the expression of RUNX2 and ALP proteins, without affecting the ALP activity in MSCs and osteoblasts. Our data indicate that Hypoxia regulates the BMP signaling pathway in MSCs^{BMP-9+} and that MC derived from these cells cultured under Hypoxic conditions enhances cell migration and osteoblastic differentiation of MSCs and osteoblasts. The use of MC or molecules secreted by MSCs overexpressing BMP-9 cultured under Hypoxia have the potential to increase bone formation.

Keywords: Hypoxia. Stem cell. Bone. Osteoblast. BMP.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Viabilidade celular de MSCs^{BMP-9+} cultivadas na presença de 100, 150 e 200 μ M de CoCl₂ nos últimos 3 (A), 5 (B) e 7 (C) dias de cultivo; MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de CoCl₂ foram utilizadas como Controle. Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 67
- Figura 2:** Viabilidade celular de MSCs^{BMP-9+} cultivadas na presença de 10, 20, 40 e 50 μ M de CoCl₂ nos últimos 3 (A), 5 (B) e 7 (C) dias de cultivo; MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de CoCl₂ foram utilizadas como Controle. Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 68
- Figura 3:** Expressão proteica de HIF-1 α em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na presença de 40 e 50 μ M de CoCl₂ nos últimos 3 e 5 dias de cultivo; MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de CoCl₂ foram utilizadas como Controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 68
- Figura 4:** Expressão gênica de alvos do HIF-1 α , *Glut1* (A) e *Vegfa* (B) em MSCs^{BMP-9+} detectados 0, 4, 8 e 12 h após a remoção da Hipóxia. MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de Hipóxia foram utilizadas como Controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 69
- Figura 5:** Expressão proteica de BMP-9 (A) em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência (Controle) ou na presença de Hipóxia. Expressão gênica de *Bmp-2* (B), *Bmp-4* (C), *Bmpr1a* (D), *Smad1* (E), *Smad5* (F), *Hey1* (G) e *Runx2* (H) em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência (Controle) ou na presença de Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 70
- Figura 6:** Viabilidade de MSCs e MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia em 24, 48 e 72 h (A e B, respectivamente). Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5) e os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 71

- Figura 7:** Migração de MSCs (A) e MC3T3-E1 (B) cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia em 0, 6, 12 e 24 h. Os dados são mostrados em porcentagem de área migrada a partir do tempo 0 e estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=5). 72
- Figura 8:** Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C) e *Oc* (D) em MSCs cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 73
- Figura 9:** Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C) e *Oc* (D) em MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 74
- Figura 10:** Atividade de ALP *in situ* em MSCs (A) e MC3T3-E1 (B) cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 74
- Figura 11:** Expressão proteica de RUNX2 (A) e ALP (B) em MSCs que cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 75
- Figura 12:** Expressão proteica de RUNX2 (A) e ALP (B) em MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). 75
- Figura 13:** Imagens das membranas capturadas pelo equipamento G-Box gel (Syngene). Membrana incubada somente com Veículo (A), Membrana incubada com MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de Hipóxia (Controle) (B), ou submetidas à Hipóxia (Hipóxia) (C). 76

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes alvo do HIF-1 α por PCR em tempo real.....	55
Tabela 2. Sequência de primers e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes da via de sinalização das BMPs por PCR em tempo real.....	57
Tabela 3. Sondas TaqMan e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes da via de sinalização das BMPs por PCR em tempo real	58
Tabela 4. Proteínas-alvos presentes nas membranas do Kit Cytokine Array – Mouse Cytokine Antibody Array (ab169810, Abcam, EUA).....	61
Tabela 5. Áreas sob as curvas (UA) de Migração de MSCs cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia.	72
Tabela 6. Áreas sob as curvas (UA) de Migração de MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia.	72
Tabela 7. Proteínas-alvos que foram detectadas nas membranas do Kit Cytokine Array – Mouse Cytokine Antibody Array e sua expressão nas culturas submetidas à Hipóxia em comparação ao Controle.	76

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	41
2 PROPOSIÇÃO	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Cultura de células	51
3.1.1 Cultura de MSCs ^{BMP-9+}	51
3.1.2 Cultura de MSCs	51
3.1.3 Cultura de células da linhagem MC3T3-E1	51
3.2 Avaliação do efeito dose-resposta e do tempo de exposição ao CoCl ₂ para indução de Hipóxia	52
3.2.1 Viabilidade celular	52
3.2.2 Expressão proteica de HIF-1 α	52
3.2.3 Efeito da Hipóxia sobre genes alvos do HIF-1 α	54
3.2.3.1 Extração de RNA total	54
3.2.3.2 Síntese da fita de DNA complementar	55
3.2.3.3 Reações de PCR em tempo real	55
3.3 Efeito da Hipóxia sobre a via de sinalização de BMPs	56
3.3.1 Expressão proteica de BMP-9	56
3.3.2 Expressão de genes da via de sinalização das BMPs	57
3.4 Obtenção de meio condicionado por MSCs ^{BMP-9+}	58
3.5 Efeito do meio condicionado por MSCs ^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e MC3T3-E1	59
3.5.1 Viabilidade celular	59
3.5.2 Migração celular	59

3.5.3 Diferenciação osteoblástica.....	60
3.5.3.1 Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos	60
3.5.3.2 Atividade de ALP.....	60
3.5.3.3 Expressão proteica de RUNX2 e ALP	60
3.6 Detecção da expressão de proteínas em MSCs ^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia	61
3.7 Análise estatística.....	63
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Avaliação do efeito dose-resposta e do tempo de exposição ao CoCl ₂ para indução de Hipóxia.....	67
4.1.1 Viabilidade celular	67
4.1.2 Expressão proteica de HIF-1 α	68
4.1.3 Efeito da Hipóxia sobre genes alvos do HIF-1 α	69
4.2 Efeito da Hipóxia sobre a via de sinalização de BMPs.....	70
4.3 Efeito do meio condicionado por MSCs ^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e MC3T3-E1	71
4.3.1 Viabilidade celular	71
4.3.2 Migração celular	71
4.3.3 Expressão gênica de marcadores osteoblásticos	73
4.3.4 Atividade de ALP.....	74
4.3.5 Expressão proteica de RUNX2 e ALP	75
4.4 Detecção da expressão de proteínas em MSCs ^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia	75
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÃO	87
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e matriz extracelular mineralizada que estão envolvidas no seu desenvolvimento e homeostase, que é regulada pela constante deposição e reabsorção, processo conhecido como remodelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) Suas funções mais conhecidas são a de suporte para os tecidos moles incluindo a musculatura esquelética, que possibilita a mobilidade e proteção a órgãos vitais, a homeostase de íons, principalmente Ca e P, a regulação da tolerância à glicose e a produção de testosterona, nestas duas últimas atuando como órgão endócrino (GUNTUR; ROSEN, 2012).

Uma das características do tecido ósseo é sua capacidade de regeneração quando lesado por traumas, infecções ou neoplasias, mas que dependendo da natureza e da extensão do dano, bem como das condições locais e sistêmicas, é comprometida, conforme relatado em 10% a 20% das fraturas traumáticas (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010; LONGONI et al., 2018). Nestas últimas situações, tratamentos adicionais são necessários para se obter a regeneração óssea, dentre os quais incluem-se aqueles baseados no uso de células ou seus derivados (ROSA; DE OLIVEIRA; BELOTI, 2008).

De especial interesse para a terapia celular são as células-tronco mesenquimais (MSCs), que são células indiferenciadas encontradas em vários tecidos de mamíferos que apresentam, dentre outras características, capacidade de autorrenovação e de diferenciação em multilinhagens, incluindo adipócitos, condrócitos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006). Atualmente, as MSCs são utilizadas na terapia de várias doenças, tais como Parkinson, esclerose múltipla, Alzheimer, infarto do miocárdio, degeneração da retina, Crohn e diabetes tipo 1 (MERIMI et al., 2021).

Nosso grupo de pesquisa tem avaliado MSCs derivadas da medula óssea, do tecido adiposo e do ligamento periodontal, e MSCs diferenciadas em osteoblastos para promover o reparo ósseo (ADOLPHO et al., 2022; FREITAS et al., 2019a, 2019b), além de osteoblastos isolados de calvária de ratos recém-nascidos ou isolados dos ossos frontal e parietais (SOUZA et al., 2018, 2020). Esses estudos mostraram significativa formação óssea em defeitos tratados com os diferentes tipos celulares utilizados quando comparados com defeitos não tratados. Embora esses resultados sejam promissores e comprovem a eficácia da terapia celular, a completa regeneração óssea ainda não foi observada.

A ausência da completa regeneração óssea pode estar relacionada, ao menos em parte, ao uso de células não submetidas a qualquer tipo de modificação ou condicionamento previamente à injeção nos defeitos ósseos. Tanto é que, recentemente, demonstramos que MSCs modificadas geneticamente para expressar a proteína morfogenética 9 (BMP-9) além de apresentarem maior potencial de diferenciação osteoblástica, induzem maior formação óssea do que MSCs não modificadas (FREITAS et al., 2021) e existem evidências de que vários pré-tratamentos das MSCs podem aumentar sua eficácia nos procedimentos de medicina regenerativa (BALDARI et al., 2017; LEE; KANG, 2020; NORONHA et al., 2019; RAZIYEVA et al., 2020). Esses pré-tratamentos podem ser feitos pelo uso de mediadores e citocinas inflamatórias, drogas, biomateriais e condições de cultura diferentes das condições padronizadas, o que inclui cultivar as MSCs em Hipóxia, ou seja, em baixas concentrações de oxigênio (GOODMAN; LIN, 2020; NORONHA et al., 2019). Esta última parece ser uma alternativa atraente pela possibilidade de potencializar os efeitos terapêuticos das MSCs (DAS et al., 2010).

A Hipóxia em cultura de células ocorre pela manutenção das células em concentrações de oxigênio variando entre 1 e 7%, diferente das condições normais de cultura que se dão com as células mantidas em 5% de gás carbônico e 95% de ar atmosférico, ou seja, em torno de 21% de oxigênio. Interessante observar que, em seus nichos teciduais, isto é, sob condições fisiológicas, as MSCs são mantidas em concentrações de oxigênio variando entre 2 e 8% que se assemelham às condições de Hipóxia (MOHYELDIN; GARZÓN-MUVDI; QUIÑONES-HINOJOSA, 2010).

Experimentalmente, a Hipóxia pode ser induzida em cultura de células pelo cultivo em câmaras de Hipóxia que permitem controlar a concentração de oxigênio ou pela adição de compostos químicos ao meio de cultura que bloqueiam a degradação do fator induzido por Hipóxia (HIF-1 α) e, portanto, mimetizam os efeitos da Hipóxia. Os mimetizadores químicos da Hipóxia são bastante atraentes para experimentos com cultura porque são de custo mais baixo, mais estáveis do que as câmaras de Hipóxia e permitem a manipulação das placas de cultura, além do que, seus efeitos sobre as células são comparáveis aos obtidos com a Hipóxia (BEFANI et al., 2013; TETI et al., 2018). Um dos principais agentes químicos utilizados é o Cloreto de Cobalto (CoCl₂), que estabiliza HIF-1 α em concentrações variando entre 50 e 200 μ M por períodos de algumas horas até 13 dias, sendo necessário padronizar ambos para cada tipo de célula a ser avaliado (MUÑOZ-SÁNCHEZ; CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2019; WU; YOTNDA, 2011).

Existem vários estudos mostrando que MSCs cultivadas em Hipóxia apresentam aumento na expressão dos fatores induzidos por Hipóxia (HIF, do inglês *Hypoxia-inducible factor*), principalmente de HIF-1 α , que inicia uma cascata intracelular que modula a expressão de mais de 60 genes (LIN et al., 2017). Como resultante deste processo, ocorrem melhoras em várias das propriedades biológicas das MSCs, incluindo aumento da proliferação, da capacidade de auto renovação e formação de colônias, migração, expressão de marcadores de células-tronco e na liberação de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA), fator de crescimento de fibroblastos (FGF2), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento insulina-símile (IGF) (CRISOSTOMO et al., 2008; KIM et al., 2016; LENNON; EDMISON; CAPLAN, 2001; RASMUSSEN et al., 2011; RAZIYEVA et al., 2020). A combinação destas melhoras nas propriedades biológicas contribuiria para aumentar o potencial terapêutico das MSCs para regenerar tecidos, principalmente, considerando que a ação parácrina sobre as células que participam da regeneração, que no tecido ósseo são MSCs derivados da medula óssea e osteoblastos (WALMSLEY et al., 2016), seria o efeito terapêutico mais importante (BALDARI et al., 2017; CHEN et al., 2014; GOODMAN; LIN, 2020).

Alguns estudos exploraram os efeitos do secretoma liberado por MSCs sob Hipóxia diretamente injetados em defeitos de fêmures (LIU et al., 2020) ou utilizados associados à biomaterial para substituição óssea (QUADE et al., 2020). Em geral, as evidências são favoráveis ao aumento da formação óssea por MSCs submetidas à Hipóxia. Também é interessante que foi demonstrado efeito sinérgico entre HIF-1 α e BMP-9 no aumento da diferenciação angiogênica e osteoblástica de MSCs (AMIR et al., 2022; HU et al., 2013; LI et al., 2022) que abre oportunidades para aproveitar esse sinergismo na terapia celular para regeneração óssea.

Considerando o acima exposto, nossas hipóteses são que a Hipóxia regula a expressão de componentes e alvos da via de sinalização de BMPs em MSCs^{BMP-9+} e que o secretoma dessas células cultivadas sob Hipóxia aumenta a migração e diferenciação osteoblástica. Para testar essas hipóteses, MSCs^{BMP-9+} foram cultivadas em Hipóxia para avaliar a expressão proteica e gênica de componentes da via de sinalização de BMPs e o efeito do secretoma presente no meio condicionado por essas células sobre a proliferação, migração e diferenciação osteoblástica das células que participam mais ativamente no processo de regeneração óssea, MSCs da medula óssea e osteoblastos.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da Hipóxia em MSCs^{BMP-9+} e dos meios condicionados por essas células no potencial osteogênico de MSCs e osteoblastos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dose-resposta do CoCl₂ e do tempo de exposição na viabilidade celular, na expressão proteica de HIF-1 α e seus alvos em MSCs^{BMP-9+}.
- Avaliar o efeito da Hipóxia sobre a via de sinalização de BMPs em MSCs^{BMP-9+}.
- Avaliar o efeito do secretoma presente no meio condicionado por MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para todas as culturas de células, a cada 48 h houve troca do meio de cultura e as células foram mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.1.1 Cultura de MSCs^{BMP-9+}

Foram utilizadas MSCs^{BMP-9+}, que são MSC derivadas da medula óssea de camundongos imortalizadas e editadas geneticamente por CRISPR-Cas9 (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9*), descritas e caracterizadas previamente (FREITAS et al., 2021). As células foram cultivadas em meio de crescimento, que é meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-Life Technologies), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA). Após atingirem 70-80% de confluência, houve remoção do meio de cultura e adição de solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA 1 mM (Gibco) para obtenção da suspensão de células que foi plaqueada para a realização dos experimentos descritos abaixo.

3.1.2 Cultura de MSCs

Foram utilizadas MSCs derivadas da medula óssea de camundongos que haviam sido imortalizadas e caracterizadas como descrito previamente (FREITAS et al., 2021). As células foram cultivadas como descrito acima.

3.1.3 Cultura de células da linhagem MC3T3-E1

Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, EUA), foram cultivadas como descrito acima, exceto que, o meio de crescimento foi suplementado com 10% de SFB (Gibco) e após o plaqueamento, foram cultivadas em meio osteogênico, que é o meio de crescimento suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco) e betaglicerofosfato a 7 mM (Sigma).

3.2 Avaliação do efeito dose-resposta e do tempo de exposição ao CoCl_2 para indução de Hipóxia

3.2.1 Viabilidade celular

Para determinar o regime de tratamento das culturas, isto é, a concentração e o tempo de exposição ao CoCl_2 , MSCs^{BMP-9+} foram cultivadas na concentração de 2×10^4 células/poço (n=5) em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated) por 8 dias.

O cloreto de cobalto hexahidratado (II) ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 237,93 g/mol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi diluído em água deionizada seguindo as orientações do fabricante, imediatamente antes do seu uso, filtrado em filtro de 0,22 μm (Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Co Cork, IRELAND) e adicionado ao meio de cultura na concentração final para indução de Hipóxia selecionada para cada experimento. MSCs^{BMP-9+} mantidas em meio de cultura sem adição de CoCl_2 foram utilizados como Controle.

Foram adicionados ao meio de cultura 100, 150 e 200 μM de CoCl_2 após 24 h do plaqueamento e mantidos por 7 dias (a partir do dia 1 até o dia 8), por 5 dias (a partir do dia 3 até o dia 8) e por 3 dias (a partir do dia 5 até o dia 8).

No dia 8, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS (Gibco) aquecido a 37 °C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT 10% (5 mg/mL) e incubados a 37 °C por 4 h. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 min e uma alíquota de 150 μL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços (Corning Incorporated). A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro μQuant (BioTek Instruments Inc., Winooski, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos como porcentagem das culturas Controle que foram consideradas 100%.

Devido à redução da viabilidade celular nas culturas acima, foram avaliadas as concentrações de 10, 20, 40 e 50 μM de CoCl_2 , adicionadas ao meio de cultura pelos mesmos tempos de exposição descritos acima. Os regimes de tratamento que não afetaram a viabilidade celular foram utilizados nos experimentos seguintes.

3.2.2 Expressão proteica de HIF-1 α

Para confirmar que a adição de CoCl_2 induziu Hipóxia, MSCs^{BMP-9+} foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células em placas de petri de poliestireno de 100 mm (Corning

Incorporated) por 8 dias com adição de 40 e 50 μM de CoCl_2 nos últimos 5 e 3 dias. $\text{MSCs}^{\text{BMP-9+}}$ mantidas em meio de cultura sem adição de CoCl_2 foram utilizadas como Controle.

No dia 8, a expressão proteica de HIF-1 α foi avaliada por western blotting. O meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas com PBS (Gibco) as células lisadas com 300 μL de tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay – RIPA) e sonicadas utilizando ultrassom (Misonix, Farmingdale, EUA). Para identificação da concentração de proteínas das amostras, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizou-se o kit comercial DCTM Protein Assay (BioRad, EUA) seguindo as orientações do fabricante e espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc), considerando comprimento de onda de 750 nm. Foram preparados géis de acrilamida 10% montados em aparato próprio e adicionado tampão de corrida. Foram utilizadas amostras contendo 50 μg de proteína de cada grupo, contidas em um volume final de 35 μL , dos quais 7 μL eram tampão de amostra, sendo aquecidas em banho-maria a 95 °C por 5 min. A separação das proteínas foi realizada por eletroforese com aplicação de 80 V por aproximadamente 2 h e foi utilizado, como referência, um marcador de peso molecular que identifica bandas entre 10 e 250 kDa (Bio-Rad Laboratories).

As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de PVDF 0,2 μm (BioRad) com o aparelho Trans-Blot® Turbo (BioRad), operado com 25 V por 10 min. Foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado a 5% (Bio-Rad) diluído em tampão salino com Tris e 0,1% Tween-20 (TBS-T, Sigma) por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada overnight a 4 °C com o anticorpo primário HIF-1 α (coelho monoclonal, 1:1000, Cell Signaling, EUA) e em seguida com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano cabra-anti-coelho IgG (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 1 h a temperatura ambiente. Após cada incubação, foram realizadas três lavagens das membranas, durante 5 min, com TBS-T.

Ao final, para a identificação das marcações, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente ClarityTM Western ECL Substrate (BioRad) por 1 min e levadas para o aparelho G:BOX (SynGene, EUA). O programa GeneSnap (SynGene) foi utilizado para obtenção das imagens das bandas relativas às proteínas-alvo e o programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para obtenção dos dados quantitativos. Para a marcação da proteína constitutiva, a membrana foi limpa com Re-blot Plus Strong (Millipore, EUA) e incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário anti- β -Actina (Camundongo monoclonal, 1:1000, Cell Signaling), em seguida, com o anticorpo secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma) por 1 h a temperatura ambiente. Após a lavagem das membranas, foi

acrescentada solução reveladora e as imagens capturadas no equipamento G-Box gel (Syngene, Reino Unido). As imagens foram analisadas com o software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health) e os dados (n=3) da expressão da proteína HIF-1 α foram normalizados pela proteína constitutiva β -Actina.

A adição de 40 μ M de CoCl₂ por 3 dias se mostrou mais eficaz em induzir a Hipóxia e, portanto, utilizada em todos os experimentos seguintes. Para tanto, MSCs^{BMP-9+} foram cultivadas na concentração de 1x10⁶ células em placas de petri de poliestireno de 100 mm (Corning Incorporated) por 8 dias com adição de 40 μ M de CoCl₂ nos últimos 3 dias e MSC^{BMP-9+} mantidas em meio de cultura sem adição de CoCl₂ foram utilizadas como Controle.

3.2.3 Efeito da Hipóxia sobre genes alvos do HIF-1 α

O efeito da Hipóxia sobre genes alvos da proteína HIF-1 α , *Glut1* (do inglês *solute carrier family 2 - facilitated glucose transporter, member 1*) e *Vegfa* (do inglês *vascular endothelial growth factor A*) foi avaliado por PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) em tempo real. Para avaliar a duração do efeito da Hipóxia, os meios de cultura foram trocados por α -MEM suplementado com 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco) sem a presença de SFB e CoCl₂. Ao final de 0, 4, 8 e 12 horas, as células foram lisadas com 1 mL do reagente Trizol (Gibco), mantidas a temperatura ambiente durante 15 min e armazenadas no freezer -20°C.

3.2.3.1 Extração de RNA total

Os lisados celulares, obtidos como descrito acima, foram descongelados, adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merck) e os tubos foram vigorosamente agitados por 30 s e mantidos no gelo durante 5 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 12000 g, por 15 min, e a fase aquosa (superior) coletada em novos tubos de 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 250 μ L de etanol 96% (Merck) às amostras e as mesmas centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O restante do processo de extração de RNA total foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

A concentração e pureza do RNA total foram avaliadas em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/ μ L e contaminação por proteínas e fenol, respectivamente. Foi realizada avaliação da integridade do RNA total por meio do aparelho

Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, EUA), partir de 100 ng do RNA total, seguindo as orientações do fabricante e considerando adequados valores de RIN (RIN, do inglês: *RNA Integrity Number*) superiores a 7 (FLEIGE; PFAFFL, 2006; SCHROEDER et al., 2006).

3.2.3.2 Síntese da fita de DNA complementar

Foi realizada a confecção da fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo de 200 µL (Axygen Scientific Inc., Union City, California, EUA) foram adicionados: 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL de água previamente tratada com DEPC (Sigma), 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradiente (Eppendorf AG) sob as seguintes condições: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação de transcrição reversa as amostras de cDNA foram estocadas em freezer -20 °C.

3.2.3.3 Reações de PCR em tempo real

Para a reação de PCR em tempo real, foi utilizado sistema SYBR e para isso foram utilizados primers previamente desenhados e sintetizados para os genes-alvo do HIF-1α e de referência (Life Technologies) relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes alvo do HIF-1α por PCR em tempo real

Símbolo do Gene	Sequência Foward e Reverse	Pb*
<i>Vegfa</i>	AGCAGATGTGAATGCAGACCA	112
	AGGATTTAAACCGGGATTTCTTGC	
<i>Glut1</i>	CTGTCGGGTATCAATGCTGTGT	149
	CGTCCAGCTCGCTCTACAAC	
<i>Eif2b1</i>	ACCTCCCTGGAATACTCTGACT	136
	TCGCCCCGTCTTTGATGAAT	

*Pares de bases nitrogenadas

As reações foram realizadas no aparelho QuantStudio7™ Flex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), em quadruplicata (n=4), utilizando 7 µL de Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 0,5 µL de primer Forward, 0,5 µL de primer Reverse e 5 µL de cDNA (12,5 ng), para um volume final de 13 µL/reacção. As reações de amplificação consistiram em 20 s a 95 °C e quarenta ciclos de 3 s a 95 °C (denaturação) e de 30 s a 60 °C (anelamento e extensão). Como controle endógeno, a expressão gênica de *Eif2b1* (do inglês *eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta*) foi utilizada para normalizar os níveis de expressão dos genes avaliados. Para comparar a expressão gênica dos diferentes grupos experimentais, foi utilizado o método comparativo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.3 Efeito da Hipóxia sobre a via de sinalização de BMPs

Foram avaliados os efeitos da Hipóxia na expressão proteica de BMP-9 e gênica de *Bmp-4* e *Bmp-2*, bem como *Bmpr1a* (do inglês *bone morphogenetic protein receptor, type 1A*), *Smad1* (do inglês *SMAD family member 1*), *Smad5* (do inglês *SMAD family member 5*), *Hey1* (do inglês *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif*) e *Runx2* (do inglês *runt related transcription factor 2*).

3.3.1 Expressão proteica de BMP-9

A expressão proteica de BMP-9 foi avaliada por ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunoassay*) utilizando o Mouse BMP-9 ELISA Kit (Abcam, ab267576, Cambridge, Reino Unido) de acordo com as recomendações do fabricante.

O meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas com PBS (Gibico) e as células, lisadas com 300 µL de tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay – RIPA) utilizando ultrassom (Misonix, Farmingdale). Para identificação da concentração de proteínas das amostras, em µg/µL, utilizou-se o kit comercial DC™ Protein Assay (BioRad) seguindo as orientações do fabricante e espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc), considerando comprimento de onda de 750 nm.

Brevemente, 100 µg de proteína total de cada amostra foram incubadas por 2,5 h à temperatura ambiente na placa contendo os anticorpos primários anti-BMP-9. Após este período, as amostras foram incubadas com o anticorpo biotilado por 1 h. Após lavagem, as amostras foram incubadas com o conjugado steptavidina horseradish peroxidase (HRP) por 45

min à temperatura ambiente. Após a lavagem das amostras, foi acrescentado o substrato da enzima HRP e a placa incubada por 30 min à temperatura ambiente. Na sequência, foi adicionada uma solução ácida para finalizar a reação e as amostras analisadas em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc), considerando comprimento de onda de 450 nm. A concentração de BMP-9 de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conforme as instruções do fabricante.

3.3.2 Expressão de genes da via de sinalização das BMPs

A expressão dos genes da via de sinalização de foi avaliada por PCR em tempo real, como descrito acima. Para tanto, as amostras foram lisadas com 1 ml do reagente Trizol (Gibco) e o PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção SYBR foi realizado como descrito em 3.2.3.1 a 3.2.3.3. Os primers utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de primers e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes da via de sinalização das BMPs por PCR em tempo real

Símbolo do Gene	Sequência Foward e Reverse	Pb*
<i>Runx2</i>	CTTCACAAATCCTCCCAAGTG GGAATGCGCCCTAAATCACTG	150
<i>Bmpr1a</i>	TGGGAGTGGATCTGGATTGC TCACCACGCCATTTACCCAT	120
<i>Smad1</i>	GCTTCGTGAAGGGTTGGGG GCTTCGTGAAGGGTTGGGG	147
<i>Smad5</i>	TTG TTCAGAGTAGGA ACTGCAAC GAAGCTGAGCAA ACTCCTGAT	114
<i>Hey1</i>	CCGACGAGACCGAATCAATAAC TCAGGTGATCCACAGTCATCTG	125
<i>Sp7</i>	TTCTGCGGCAAGAGGTTAC TTGCTCAAGTGGTCGCTTCT	125
<i>Alpl</i>	GGGGTACAAGGCTAGATGGC CGGGCTCAAAGAGACCTAAGA	150
<i>Oc</i>	TTCTGCTCACTCTGCTGACC GCTTGGACATGAAGGCTTTGT	99
<i>Eif2b1</i>	ACCTCCCTGGAATACTCTGACT	136

TCGCCCCGTCTTTGATGAAT

*Pares de bases nitrogenadas

As reações utilizando o sistema TaqMan foram realizadas no aparelho QuantStudio7™ Flex (Thermo Fisher Scientific), em quadruplicata (n=4), utilizando 5 µL de Fast TaqMan Master Mix (Life Technologies) e 0,5 µL de cada sonda e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reacção. As reações de amplificação consistiram em 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C, quarenta ciclos de 1 s a 95 °C (desnaturação) e de 20 s a 60 °C (anelamento e extensão). Como controle endógeno, a expressão gênica de *Eif2b1* foi utilizada para normalizar os níveis de expressão dos genes avaliados. A Tabela 3 mostra as sondas TaqMan utilizadas. Para comparar a expressão gênica dos diferentes grupos experimentais, foi utilizado o método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3. Sondas TaqMan e tamanho do fragmento (Pb) para detecção dos genes da via de sinalização das BMPs por PCR em tempo real

Símbolo do Gene	Identificação do Ensaio*	Pb**
<i>Bmp-4</i>	Mm03413826_mH	110
<i>Bmp-2</i>	Mm01962382_s1	101
<i>Eif2b1</i>	Mm00460997_m1	83

*Identificação do Ensaio de acordo com a Life Technologies

**Pares de bases nitrogenadas

3.4 Obtenção de meio condicionado por MSCs^{BMP-9+}

Para avaliar os efeitos parácrinos das MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia sobre MSCs e osteoblastos, foram obtidos meios condicionados (MC) por MSCs^{BMP-9+} tratadas com CoCl₂ 40 µM por 3 dias (MC Hipóxia) e Controle (MC Controle), como previamente descrito (CHANG et al., 2015).

Após 8 dias de cultura, os meios de cultura foram trocados por meio α -MEM suplementado com 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e as culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 4 h. Esse período foi escolhido com base nos resultados obtidos nos experimentos descritos no item 3.2.3. Os meios condicionados foram coletados, centrifugados a 300 g, a 4 °C, por 30 min para remoção de debris de células, armazenados em tubos de 50 mL e estocados a -80 °C.

3.5 Efeito do meio condicionado por MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e MC3T3-E1

Para avaliar o efeito do MC Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica, MSCs e MC3T3-E1 foram cultivadas na concentração de 2×10^4 células/poço ($n=5$) em placas de poliestireno de 24 poços (Corning) em meio de crescimento e osteogênico, respectivamente. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído de tal forma que: as MSCs foram cultivadas em meio de crescimento/MC Hipóxia (1:1) ou meio de crescimento/MC Controle (1:1); e as MC3T3-E1 em meio osteogênico/MC Hipóxia (1:1) ou meio osteogênico/MC Controle (1:1).

3.5.1 Viabilidade celular

A viabilidade de MSCs e MC3T3-E1 que permaneceram na presença de MC Hipóxia ou MC Controle por 24, 48 e 72 horas foi avaliada pelo método MTT, como descrito em 3.2.1.

3.5.2 Migração celular

A migração celular foi avaliada pelo método do *scratch* como descrito previamente (LIANG; PARK; GUAN, 2007). As MSCs e MC3T3-E1 foram cultivados em meio de crescimento e osteogênico, respectivamente, em placas de 6 poços (Corning Incorporated) até a confluência, após o que, com o auxílio de uma ponteira de pipeta de 100 μ L foram realizados dois riscos em cada poço, um horizontal e um vertical, perpendiculares entre si passando pelo centro, as culturas foram lavadas para remover fragmentos celulares e células destacadas da área riscada e foram adicionados o meio de crescimento ou osteogênico suplementados com 4% de SFB com MC Hipóxia ou MC Controle (1:1), como descrito em 3.5.1.

Pontos de referência foram demarcados na tampa de cada placa para permitir a obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões da área riscada nos diferentes períodos de avaliação. As imagens foram adquiridas por uma câmera digital, acoplada a um microscópio de fase invertido (Zeiss, Alemanha), nos períodos inicial (0) e ao final de 6, 12 e 24 h. Áreas sem células foram medidas com o software Nis Elements BR (Nikon) e os dados ($n=5$) foram apresentados como porcentagem de fechamento do risco. Para comparação estatística entre os efeitos do MC Hipóxia e MC Controle e visando avaliar seus efeitos ao longo do tempo, foram calculadas as áreas sob as curvas, em unidades arbitrárias (UA) compreendidas entre o período de 0 e 24 h de cada um dos poços.

3.5.3 Diferenciação osteoblástica

A diferenciação osteoblástica de MSCs e MC3T3-E1 que permaneceram com MC Controle ou MC Hipóxia (1:1) nas últimas 48 h foi avaliada aos 7 dias de cultura pela expressão gênica dos marcadores osteoblásticos *Runx2*, *Sp7* (do inglês *transcription factor 7*), *Alp* (do inglês *alkaline phosphatase*) e *Oc* (do inglês *osteocalcin*) por PCR em tempo real, pela atividade de fosfatase alcalina (ALP) e expressão proteica de RUNX2 e ALP.

3.5.3.1 Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos

A expressão gênica dos marcadores osteoblásticos foi feita por PCR em tempo real e as culturas foram processadas como descrito em 3.2.3.1 a 3.2.3.3. Os primers utilizados foram os mesmos mostrados na Tabela 2.

3.5.3.2 Atividade de ALP

A atividade *in situ* da ALP foi avaliada pelo método Fast red (MAJORS et al., 1997). O meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS (Gibco) aquecido a 37°C. Foi adicionado, por poço, 1 mL de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de Fast red TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck) e as placas foram mantidas por 30 min a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Em seguida, a solução foi removida e as placas ficaram à temperatura ambiente para permitir a secagem dos poços. Então, imagens macroscópicas dos poços foram obtidas digitalmente com câmera fotográfica (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram avaliados quantitativamente no software ImageJ (National Institutes of Health), sendo os dados expressos em porcentagem (%) de área.

3.5.3.3 Expressão proteica de RUNX2 e ALP

A expressão proteica de RUNX2 e ALP foi avaliada por western blotting, como descrito no item 3.2.2. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-RUNX2 (coelho monoclonal, 1:1000, Cell Signaling, EUA) e anti-Alkaline Phosphatase (coelho monoclonal, 1:1000, Abcam, USA) e em seguida com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano cabra-anti-coelho IgG (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 1 h a temperatura ambiente. Para a marcação da proteína constitutiva, foi utilizado o anticorpo primário anti-β-Actina (Camundongo monoclonal, 1:1000, Cell Signaling), e em seguida com o anticorpo

secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma) por 1 h a temperatura ambiente e reveladas e analisadas como descrito em 3.2.2.

3.6 Detecção da expressão de proteínas em MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia

Foi avaliado o efeito da Hipóxia, comparado ao Controle, em um painel de 34 proteínas, incluindo citocinas, fatores de crescimento e proteases que estão relacionadas na Tabela 4, utilizando o Kit Cytokine Array – Mouse Cytokine Antibody Array (ab169810, Abcam) de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 4. Proteínas-alvos presentes nas membranas do Kit Cytokine Array – Mouse Cytokine Antibody Array (ab169810, Abcam, EUA)

Sigla	Proteína
BFGF	Fibroblast growth factor 2 (FGF2, bFGF, FGFb)
DPPIV	Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4, DPPIV, CD26)
DTK	Protein tyrosine kinase 3(TYRO3, DTK, SKY)
E-SELECTIN	Selectin (Sele, E-Selectin, Elam)
FC GAMMA RIIB	Fc fragment of IgG receptor IIb (FCGR2B, FC GAMMA RIIB)
FLT-3 LIGAND	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3LG, LY72L, FLT-3 LIGAND)
GITR	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18 (TNFRSF18, AITR, GITR)
HGF R	Hepatocyte growth factor (HPTA, HGF, HGF R)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54, ICAM-1)
IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding protein 2 (IBP-2, IGFBP-2)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 (IGF-1, IGF-I)
IGF-2	Insulin-like growth factor 2 (IGF-2, IGF-II)
IL-15	Interleukin 15 (IL-15)
IL-17B R	Interleukin-17 receptor B (IL-17RB, IL-17B RECEPTOR, IL-17B R)
IL-7	Interleukin-7 (IL-7)
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (CXCL11, I-TAC)
LUNGKINE	C-X-C motif chemokine 15 (CXCL15, LUNGKINE)
MDC	C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22, ABCD-1, MDC)
MMP-2	Matrix metalloproteinase 2 (CLG4A, GELA, MMP-2)
MMP-3	Matrix metalloproteinase 3 (STMY1, STR1, MMP-3)
OPN	Osteopontin (SPP1, OP, OPN)
OPG	Osteoprotegerin (TR1, OPG)
PRO-MMP-9	Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9, PRO-MMP-9)
RETN	Resistin (RSTN, RETN)
SHH-N	Sonic Hedgehog N-Terminal (SHH-N)
THYMUS CK-1	<i>Thymus Chemokine-1</i> (CXCL7, <i>THYMUS CHEMOKINE-1</i>)
TIMP-2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (D11BWG1104E, TIMP-2)
TRANCE	TNF superfamily member 11 (RANKL; TNLG6B; TRANCE)
TROY	TNF receptor superfamily member 19 (TAJ; TRADE, TROY)
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor-1 (FLT-1, VEGFR1)

VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR, FLK1, VEGFR2)
VEGFR3	Vascular endothelial growth factor receptor-3 (FLT4, VEGFR3)
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor D (FIGF, VEGF-D)

O meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas com PBS (Gibco) e as células, lisadas com 300 µL de tampão de lise do próprio kit utilizando ultrassom (Misonix). Para identificação da concentração de proteínas das amostras, em µg/µL, utilizou-se o kit comercial DC™ Protein Assay (BioRad) seguindo as orientações do fabricante e utilizando espectrofotômetro (BioTek Instruments), considerando comprimento de onda de 750 nm.

Brevemente, foi realizado o bloqueio das membranas à temperatura ambiente por 30 min e, em seguida, 200 µg de proteína total de cada amostra (Controle e Hipóxia) foram incubados em membranas do Cytokine Antibody Array por 4 h à temperatura ambiente. Como Controle, 1 membrana foi incubada somente com tampão de lise (Veículo) para avaliar a especificidade dos anticorpos. As membranas foram então lavadas e incubadas com o anticorpo biotinilado por 2 h. Após nova lavagem, as membranas foram incubadas com o conjugado streptavidina horseradish peroxidase (HRP) por 2 h à temperatura ambiente. Após a lavagem das membranas, foi acrescentada solução reveladora e as imagens capturadas pelo equipamento G-Box gel (Syngene) pelo mesmo tempo de exposição.

As imagens foram analisadas com o software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health) por 2 avaliadores diferentes e sem conhecimento dos grupos, em triplicata. Após obtenção dos dados de densitometria, realizou-se a subtração do background por meio da presença de Controles Negativos em cada membrana avaliada. Na sequência, os dados das membranas dos grupos Controle e Hipóxia foram subtraídos dos dados da membrana do Veículo e utilizados na seguinte fórmula:

$$X(Ny) = X(y) \times P1/P(y)$$

Onde:

$X(Ny)$ = intensidade de sinal normalizada da proteína "X" na membrana teste (Grupo Hipóxia);

$X(y)$ = densidade do sinal da proteína "X" na membrana teste "y" (Grupo Hipóxia);

P1 = média da densidade do sinal dos Controles Positivos na membrana de referência (Grupo Controle);

$P(y)$ = média da densidade do sinal dos Controles Positivos na membrana teste (Grupo Hipóxia).

3.7 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística no programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Alemanha). Todos os dados quantitativos foram submetidos ao teste de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias para selecionar testes paramétricos ou não-paramétricos para as comparações estatísticas. Os dados relativos às comparações entre dois grupos foram analisados pelo teste t, seguido pelo teste de correção de Benjamini-Hochberg se necessário, e aqueles relativos às comparações entre múltiplos grupos, por ANOVA one-way ou two-way seguido de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média e desvio padrão e o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito dose-resposta e do tempo de exposição ao CoCl_2 para indução de Hipóxia

4.1.1 Viabilidade celular

As concentrações de 100, 150 e 200 μM de CoCl_2 reduziram a viabilidade celular quando comparadas ao Controle aos 3, 5 e 7 dias de exposição ($p < 0,001$ para todas as concentrações e tempos de tratamento), (Figura 1A-C).

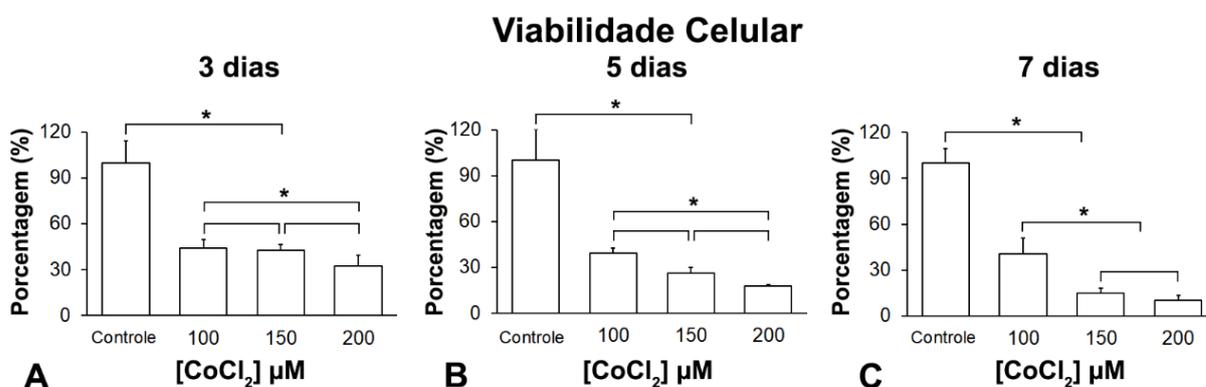


Figura 1: Viabilidade celular de $\text{MSCs}^{\text{BMP-9+}}$ cultivadas na presença de 100, 150 e 200 μM de CoCl_2 nos últimos 3 (A), 5 (B) e 7 (C) dias de cultivo; $\text{MSCs}^{\text{BMP-9+}}$ cultivadas na ausência de CoCl_2 foram utilizadas como Controle. Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=5$) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

Com base nesses resultados, foram avaliadas as concentrações de 10, 20, 40 e 50 μM de CoCl_2 . A viabilidade celular não foi afetada por nenhuma concentração de CoCl_2 quando tratadas pelos últimos 3 dias de cultivo ($p=0,371$), como mostrado na Figura 2A. Quando as células foram tratadas durante os últimos 5 dias, a viabilidade com a concentração de 50 μM não foi diferente do Controle ($p=0,142$), mas houve redução em comparação às concentrações de 10 ($p < 0,001$), 20 ($p=0,005$) e 40 μM ($p=0,018$), como mostrado na Figura 2B. Nas células tratadas durante os últimos 7 dias, ocorreu diminuição da viabilidade nas células tratadas com 50 μM CoCl_2 quando comparadas ao Controle ($p=0,001$), 10 ($p < 0,001$) e 20 μM ($p=0,012$), sem diferença para a concentração de 40 μM ($p=0,117$) (Figura 2C). No entanto, como a viabilidade celular foi de 88,74% com a concentração de 40 μM de CoCl_2 , mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle, optamos por não continuar as investigações utilizando o período de 7 dias de tratamento das culturas.

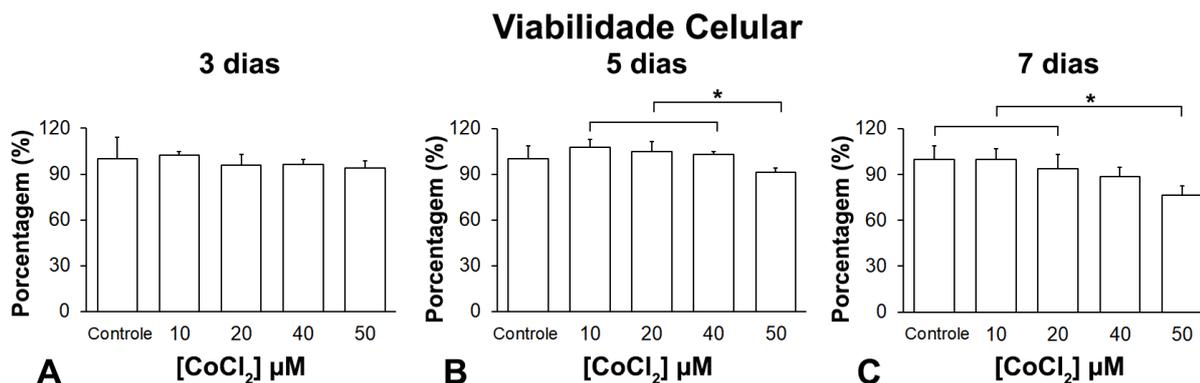


Figura 2: Viabilidade celular de MSCs^{BMP-9+} cultivadas na presença de 10, 20, 40 e 50 μM de CoCl₂ nos últimos 3 (A), 5 (B) e 7 (C) dias de cultivo; MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de CoCl₂ foram utilizadas como Controle. Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média ± desvio padrão (n=5) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (p ≤ 0,05).

4.1.2 Expressão proteica de HIF-1α

As concentrações de 40 e 50 μM de CoCl₂ nos últimos 3 e 5 dias não afetaram a viabilidade celular e foram selecionados para avaliar a expressão da proteína HIF-1α em MSCs^{BMP-9+}, que foi maior com 40 μM nos últimos 3 dias comparada com a mesma concentração nos últimos 5 dias, 50 μM nos últimos 3 e 5 dias, bem como ao Controle (p<0,001 para todas as comparações e tempos de tratamento, Figura 3). A expressão da proteína HIF-1α foi maior nas células tratadas com 40 μM de CoCl₂ nos últimos 5 dias em comparação com 50 μM nos últimos 3 (p=0,001) ou 5 (p<0,001) dias, sem diferença entre eles (p=0,202, Figura 3).

Com base nesses achados, a utilização de 40 μM de CoCl₂ por 3 dias se mostrou mais eficaz em induzir a expressão proteica de HIF-1α e foram definidos como os parâmetros para mimetizar a Hipóxia neste modelo de cultura.

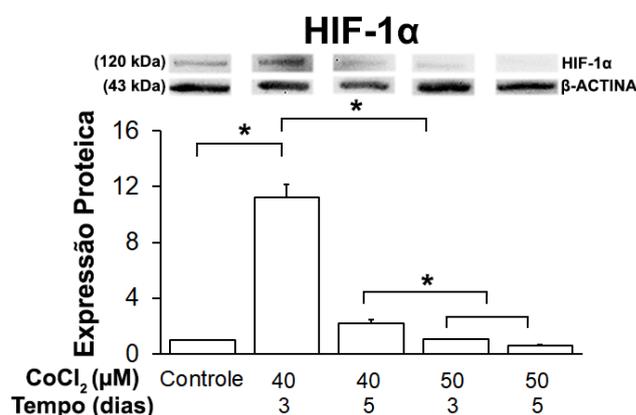


Figura 3: Expressão proteica de HIF-1α em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na presença de 40 e 50 μM de CoCl₂ nos últimos 3 e 5 dias de cultivo; MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de CoCl₂ foram utilizadas como Controle. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (p ≤ 0,05).

4.1.3 Efeito da Hipóxia sobre genes alvos do HIF-1 α

Para avaliar a duração do efeito da Hipóxia, foi avaliada a expressão dos genes alvos de HIF-1 α *Glut1* e *Vegfa* em MSCs^{BMP-9+} tratadas com 40 μ M de CoCl₂ durante os últimos 3 dias de cultura.

A expressão gênica de *Glut1* foi maior no momento da remoção do CoCl₂ (0 h) quando comparada com 4, 8 e 12 h pós-remoção e ao Controle ($p < 0,001$ para todas as comparações), assim como foi maior em 4 ($p < 0,001$), 8 ($p < 0,001$) e 12 h ($p = 0,002$) após a remoção do CoCl₂ quando comparada ao Controle. Não foram observadas diferenças entre 4 e 8 h ($p = 0,148$), 4 e 12 h ($p = 0,978$) e 8 e 12 h ($p = 0,054$) pós-remoção da Hipóxia (Figura 4A).

A expressão gênica de *Vegfa* foi maior no momento da remoção do CoCl₂ (0 h) quando comparada com 8 ($p = 0,024$) e 12 h ($p < 0,001$) pós-remoção do CoCl₂ e ao Controle ($p < 0,001$) assim como foi maior em 4 quando comparada com 12 h pós-remoção do CoCl₂ ($p = 0,002$) e ao Controle ($p = 0,002$, Figura 4B). Não foram observadas diferenças entre 8 e 4 h ($p = 0,221$), 8 e 12 h ($p = 0,122$) pós-remoção do CoCl₂ e entre 8 h e Controle ($p = 0,101$) e 12 h e Controle ($p = 1,00$, Figura 4B).

Com base nesses resultados, o tempo de 4 h se mostrou eficaz em manter os efeitos da Hipóxia após a remoção do CoCl₂, e foi definido como o tempo padrão para obtenção do meio de cultura condicionado por MSCs^{BMP-9+}, que foi utilizado nesse estudo.

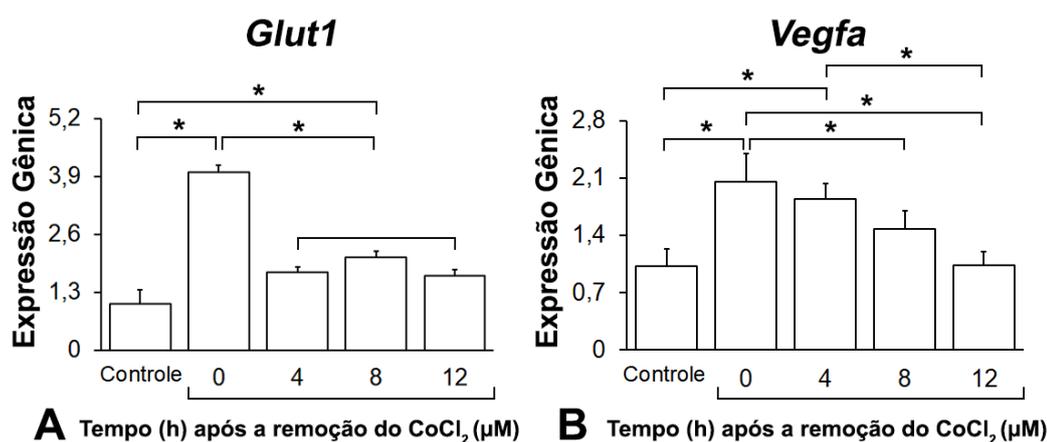


Figura 4: Expressão gênica de alvos do HIF-1 α , *Glut1* (A) e *Vegfa* (B) em MSCs^{BMP-9+} detectados 0, 4, 8 e 12 h após a remoção da Hipóxia. MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de Hipóxia foram utilizadas como Controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$) e os (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.2 Efeito da Hipóxia sobre a via de sinalização de BMPs

A Hipóxia não afetou a expressão proteica de BMP-9 quando comparada ao Controle ($p=0,219$), como demonstrado na Figura 5A. A expressão gênica de *Bmp-2* ($p=0,029$, Figura 5B) foi regulada positivamente pela Hipóxia comparada ao Controle, a expressão gênica de *Bmp-4* ($p=0,060$, Figura 5C) não foi alterada, enquanto que a expressão de *Bmpr1a* ($p=0,003$, Figura 5D) e *Smad1* ($p<0,001$, Figura 5E), foi regulada positivamente pela Hipóxia. A expressão gênica de *Smad5* ($p=0,369$, Figura 5F) não foi alterada, enquanto a de *Hey1* ($p=0,018$, Figura 5G) foi regulada positivamente e de *Runx2* ($p=0,140$, Figura 5H) não foi alterada pela Hipóxia quando comparada ao Controle.

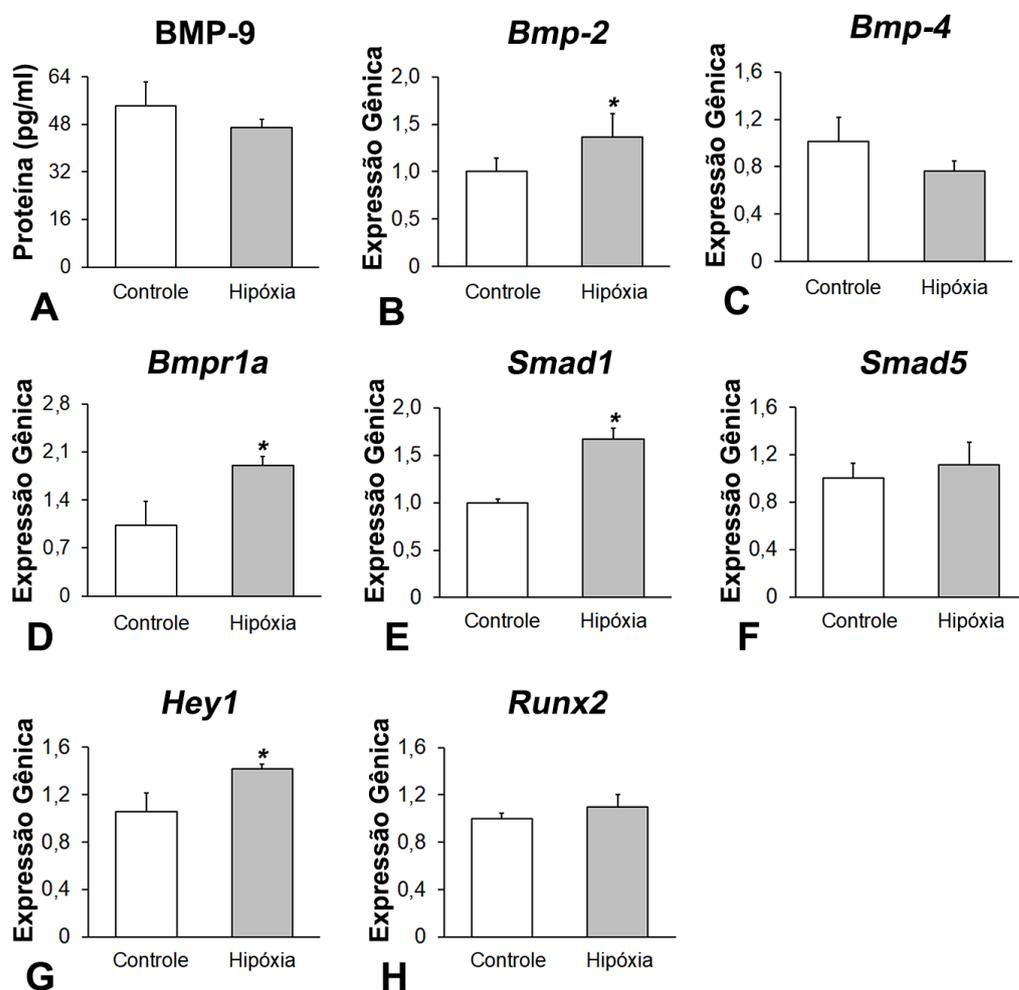


Figura 5: Expressão proteica de BMP-9 (A) em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência (Controle) ou na presença de Hipóxia. Expressão gênica de *Bmp-2* (B), *Bmp-4* (C), *Bmpr1a* (D), *Smad1* (E), *Smad5* (F), *Hey1* (G) e *Runx2* (H) em MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência (Controle) ou na presença de Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3 Efeito do meio condicionado por MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia na viabilidade, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e MC3T3-E1

4.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade de MSCs aumentou ao longo do tempo, sendo maior em 72 h em comparação com 48 h ($p=0,006$) e 24 h ($p < 0,001$), bem como foi maior em 48 do que em 24 h ($p < 0,001$) e não foi afetada pelo MC Hipóxia em comparação ao MC Controle em todos os períodos avaliados ($p=0,201$), como mostrado na Figura 6A.

A viabilidade de MC3T3-E1 também aumentou ao longo do tempo, sendo maior em 72 h em comparação com 48 h ($p=0,028$) e 24 h ($p < 0,001$), bem como foi maior em 48 do que em 24 h ($p=0,053$) e não foi afetada pelo MC Hipóxia em comparação ao MC Controle ($p=0,443$) em todos os períodos avaliados (Figura 6B).

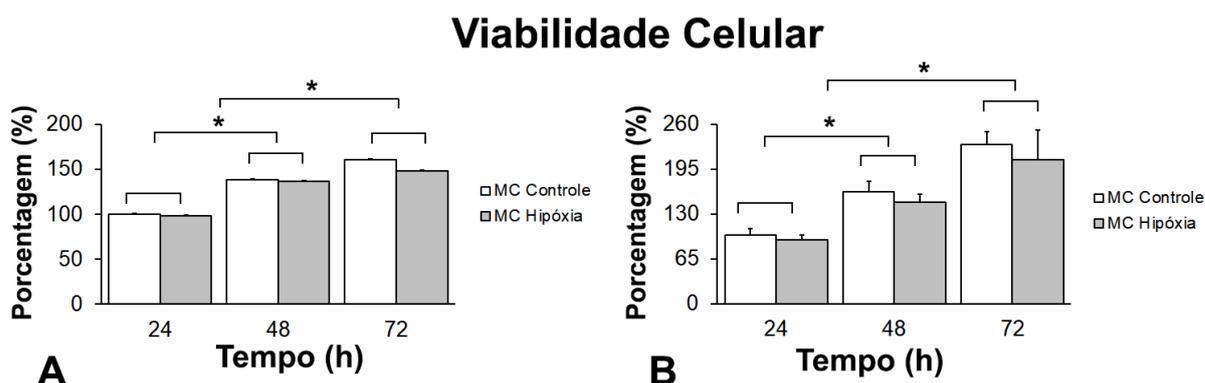


Figura 6: Viabilidade de MSCs e MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia em 24, 48 e 72 h (A e B, respectivamente). Os dados foram calculados como porcentagem do Controle e são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=5$) e os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Migração celular

A comparação entre as áreas sob as curvas mostrou que o MC Hipóxia promoveu maior migração de MSCs ($p < 0,001$ Figura 7A e Tabela 5) e MC3T3-E1 ($p=0,017$ Figura 7B e Tabela 6) comparada à migração promovida pelo MC Controle. A migração celular também aumentou ao longo do tempo para MSCs e MC3T3-E1 e ao final de 24 h os defeitos estavam completamente preenchidos por células.

Migração Celular

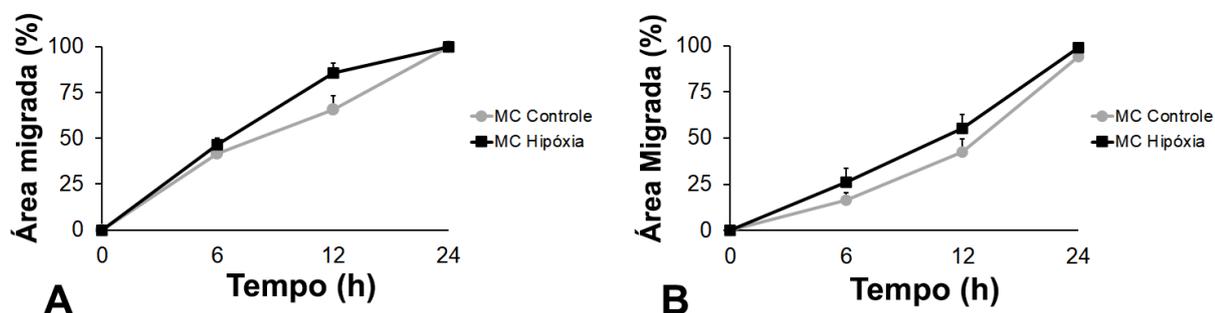


Figura 7: Migração de MSCs (A) e MC3T3-E1 (B) cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia em 0, 6, 12 e 24 h. Os dados são mostrados em porcentagem de área migrada a partir do tempo 0 e estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=5).

Tabela 5. Áreas sob as curvas (UA) de Migração de MSCs cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia.

Grupo	Tratamento	
	MC Hipóxia	MC Controle
1	294,210	239,233
2	267,297	230,109
3	269,645	240,783
4	265,868	266,752
5	277,632	222,912
Média \pm desvio padrão	274,930 \pm 11,698*	239,958 \pm 16,633

*p=0,006

Tabela 6. Áreas sob as curvas (UA) de Migração de MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia.

Grupo	Tratamento	
	MC Hipóxia	MC Controle
1	205,795	189,131
2	224,826	157,594
3	213,935	184,274
4	188,396	190,067
5	205,823	151,025
Média \pm desvio padrão	207,755 \pm 13,341*	174,418 \pm 18,633

*p=0,011

4.3.3 Expressão gênica de marcadores osteoblásticos

A expressão gênica em MSCs de *Runx2* ($p < 0,001$ Figura 8A) foi regulada negativamente pelo MC Hipóxia, a de *Sp7* (Figura 8B) não foi afetada ($p = 0,856$) e a de *Alp* ($p < 0,001$ Figura 8C) e *Oc* ($p < 0,001$ Figura 8D) também foram reguladas negativamente pelo MC Hipóxia, quando comparada ao MC Controle (Figura 8).

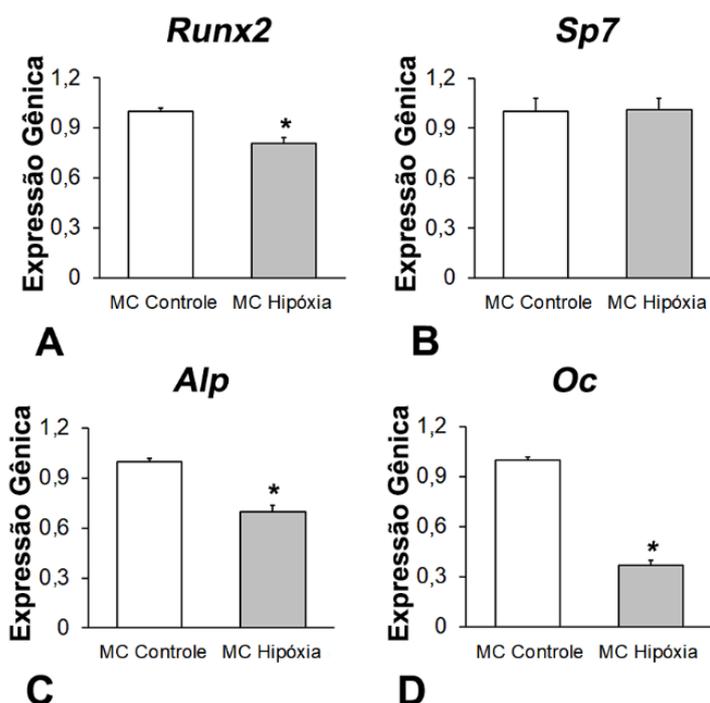


Figura 8: Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C) e *Oc* (D) em MSCs cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A expressão gênica em MC3T3-E1 de *Runx2* (Figura 9A), *Sp7* (Figura 9B), *Alp* (Figura 9C) e *Oc* (Figura 9D) foram reguladas positivamente pelo MC Hipóxia quando comparada ao MC Controle ($p < 0,001$ para todos os genes, Figura 9).

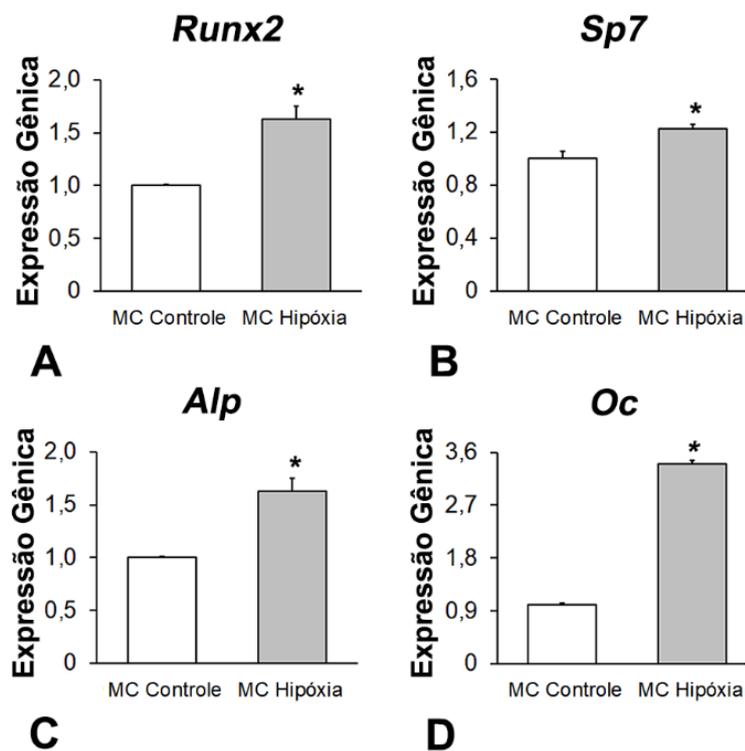


Figura 9: Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C) e *Oc* (D) em MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3.4 Atividade de ALP

A análise quantitativa não mostrou diferença na atividade de ALP *in situ* em MSCs ($p=0,169$ Figura 10A) e MC3T3-E1 ($p=0,423$ Figura 10B) cultivadas em MC Hipóxia quando comparada ao MC Controle (Figura 10).

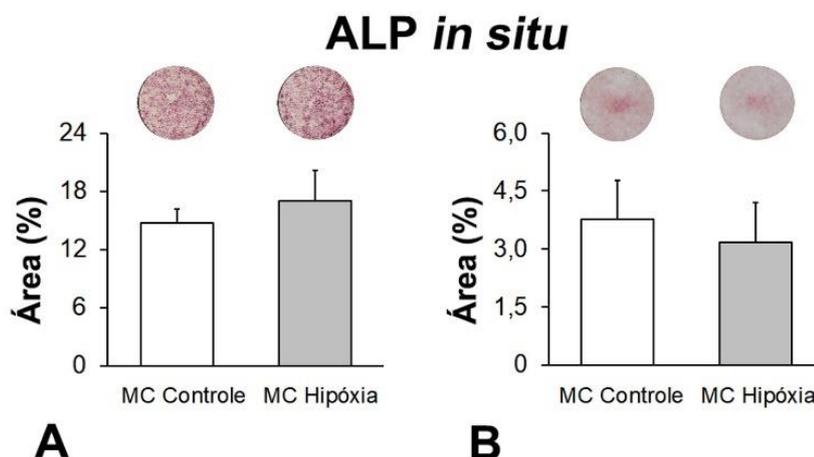


Figura 10: Atividade de ALP *in situ* em MSCs (A) e MC3T3-E1 (B) cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3.5 Expressão proteica de RUNX2 e ALP

O MC Hipóxia aumentou a expressão proteica de RUNX2 ($p = 0,003$, Figura 11A) e ALP ($p=0,006$, Figura 11B) em MSCs, assim como em MC3T3-E1 (RUNX2; $p=0,003$; Figura 12A e ALP; $p=0,006$; Figura 12B).

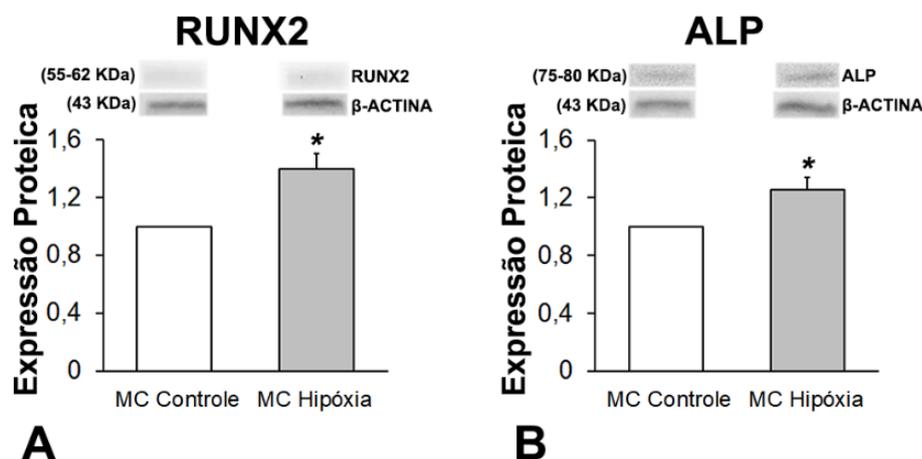


Figura 11: Expressão proteica de RUNX2 (A) e ALP (B) em MSCs que cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

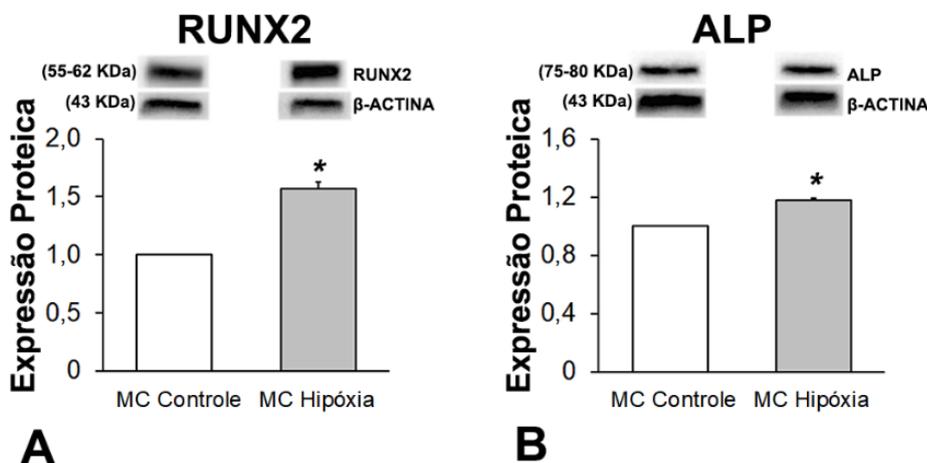


Figura 12: Expressão proteica de RUNX2 (A) e ALP (B) em MC3T3-E1 cultivadas em MC Controle ou MC Hipóxia. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$) e (*) indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.4 Detecção da expressão de proteínas em MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia

As imagens das membranas são mostradas na Figura 13A (Veículo), 13B (Controle) e 13C (Hipóxia). A Tabela 7 mostra a expressão das proteínas que foram detectadas, sendo que a expressão de OPN não foi alterada pelos tratamentos ($p=0,279$), enquanto a expressão de BFGF ($p=0,0018$), ICAM-1 ($p=0,0070$), IGFBP-2 ($p=0,0035$), IGF-1 ($p=0,0023$), I-TAC ($p=0,0280$),

LUNGKINE ($p=0,0012$) e TIMP-2 ($p=0,0014$) foram moduladas negativamente pela Hipóxia em comparação ao Controle. As demais proteínas contidas no array, não foram detectadas nas culturas Controle (Figura 13B) ou naquelas submetidas à Hipóxia (Figura 13C).

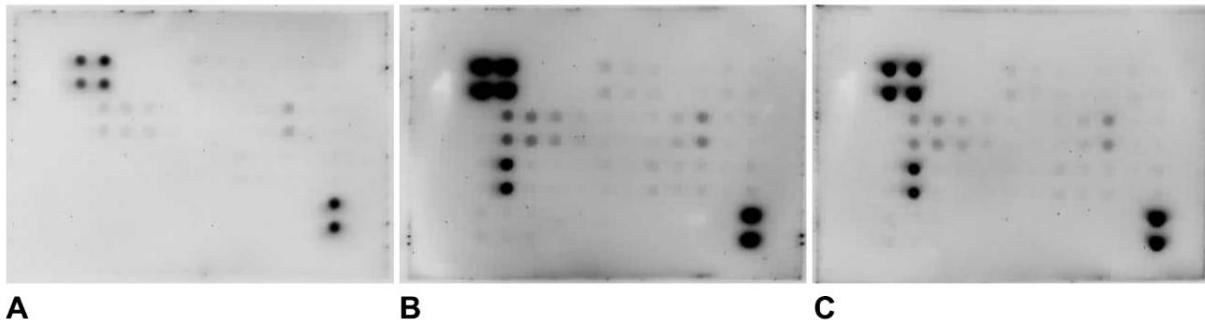


Figura 13: Imagens das membranas capturadas pelo equipamento G-Box gel (Syngene). Membrana incubada somente com Veículo (A), Membrana incubada com MSCs^{BMP-9+} cultivadas na ausência de Hipóxia (Controle) (B), ou submetidas à Hipóxia (Hipóxia) (C).

Tabela 7. Proteínas-alvos que foram detectadas nas membranas do Kit Cytokine Array – Mouse Cytokine Antibody Array e sua expressão nas culturas submetidas à Hipóxia em comparação ao Controle.

Sigla	Expressão em Hipóxia	Valor de p
BFGF	↓	$p=0,0018$
ICAM-1	↓	$p=0,0070$
IGFBP-2	↓	$p=0,0035$
IGF-1	↓	$p=0,0023$
I-TAC	↓	$p=0,0280$
LUNGKINE	↓	$p=0,0012$
OPN	Não modulado	$p=0,279$
TIMP-2	↓	$p=0,0014$

↓=Regulado negativamente em comparação ao Controle

Discussão

5 DISCUSSÃO

A terapia com injeção direta de MSCs em defeitos ósseos aumenta a formação óssea, mas sem induzir a completa regeneração, ao menos em parte, porque as MSCs, para aumentar seu potencial regenerativo, precisam de condicionamentos ou modificações previamente ao seu uso terapêutico. A modificação gênica de MSCs para expressar BMP-9, a mais osteogênica da família das BMPs, induz aumento da formação óssea, mas ainda sem resultar na regeneração do tecido ósseo (CHENG et al., 2003; FREITAS et al., 2021), indicando a necessidade de outras modificações dessas MSCs para aumentar sua efetividade terapêutica. Nesse sentido, as evidências de que BMP-9 e HIF-1 α , que está aumentado em condições de Hipóxia celular, têm efeito sinérgico sobre MSCs para aumentar seu potencial angiogênico e osteogênico (AMIR et al., 2022; HU et al., 2013; LI et al., 2022) sugerem que MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia são promissoras para se obter a regeneração do tecido ósseo. Neste estudo, foram avaliados *in vitro* os efeitos da Hipóxia sobre as vias de sinalização de BMPs em MSCs^{BMP-9+} e o efeito do secretoma de MSCs^{BMP-9+} submetidas à Hipóxia sobre a proliferação, migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos por serem essas células aquelas mais envolvidas na regeneração do tecido ósseo.

O CoCl₂ é considerado mimetizador de Hipóxia porque previne a degradação do HIF-1 α , apesar de diferentes resultados terem sido relatados em relação aos efeitos da baixa concentração de O₂, que são mais pronunciados em osteoblastos (HSU; CHEN; WEI, 2013; REZAEI et al., 2022). Esse achado pode estar relacionado ao fato de que a disponibilidade de oxigênio pode afetar outros mecanismos celulares além da estabilização do HIF-1 α (REZAEI et al., 2022). No entanto, como um dos principais efeitos da Hipóxia é a inibição da degradação do HIF-1 α , o CoCl₂ é uma ferramenta eficaz para reproduzir um microambiente de Hipóxia *in vitro* (YU et al., 2018; ZHENG et al., 2021) e para mimetizar o microambiente de Hipóxia em nosso modelo de cultura celular, considerando a necessidade de estabelecer parâmetros adequados à cada tipo de cultura devido a variações de concentração e tempo de exposição relatadas na literatura (MUÑOZ-SÁNCHEZ; CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2019; WU; YOTNDA, 2011).

Portanto, foi avaliado o efeito do CoCl₂ nas concentrações de 100, 150 e 200 μ M pelos períodos de 3, 5 e 7 dias, sendo que todas as concentrações e períodos de tratamento resultaram em redução da viabilidade celular, o que está de acordo com os resultados de (NIU et al., 2019; YU et al., 2018) que observaram diminuição da viabilidade de osteoblastos e MSCs,

respectivamente, com concentrações de CoCl_2 acima de 100 μM . A partir disso, foram avaliadas as concentrações de 10, 20, 40 e 50 μM de CoCl_2 pelos mesmos períodos, a partir do que selecionamos as concentrações de 40 e 50 μM de CoCl_2 por 3 e 5 dias, por serem as maiores concentrações que não afetaram a viabilidade celular, para avaliar a expressão do HIF-1 α , o parâmetro que indica a ocorrência de Hipóxia (YU et al., 2019). A maior expressão de HIF-1 α foi observada com o tratamento das MSCs^{BMP-9+} com 40 μM de CoCl_2 por 3 dias, que foi utilizada nos experimentos seguintes.

Confirmada a Hipóxia, foi avaliada a duração do seu efeito por meio da expressão gênica de dois genes alvos da proteína HIF-1 α , *Glut1* e *Vegfa* (TOBERER et al., 2021). Para ambos os genes, a expressão foi maior imediatamente após a remoção do CoCl_2 , mas ainda acima da expressão deles em MSCs^{BMP-9+} sem Hipóxia até 12 h. No entanto, a expressão de *Glut1* apresentou grande redução após 4 h da remoção da Hipóxia, embora tenha se mantido constante entre 4 e 12 h, enquanto a expressão de *Vegfa* mostrou diminuição contínua ao longo dos períodos de avaliação, mas ainda foi detectada após 12 h em níveis superiores àqueles das MSCs^{BMP-9+} sem Hipóxia. Conquanto, a literatura contenha vários estudos mostrando aumento na expressão gênica e proteica de *Glut1* e *Vegfa* (NIU et al., 2019; TOBERER et al., 2021; YU et al., 2019), não há informação de por quanto tempo esse efeito dura após a remoção da Hipóxia. A partir dos resultados obtidos, escolhemos o período de 4 h, principalmente baseados na expressão de *Vegfa*, para obtermos os secretomas das MSCs^{BMP-9+} contidos no meio condicionado e que foram utilizados nas avaliações da viabilidade e migração de MSCs e osteoblastos.

Considerando que há sinergismo entre os efeitos da BMP-9 e de HIF-1 α na diferenciação osteoblástica de MSCs, mas observados em experimentos com adição exógena de BMP-9 (AMIR et al., 2022; HU et al., 2013; LI et al., 2022), neste estudo investigamos o efeito da Hipóxia na expressão proteica de BMP-9 e na expressão de genes envolvidos na sinalização de BMPs em MSCs^{BMP-9+}. Interessante que a BMP-9 aumenta a expressão de HIF-1 α (AMIR et al., 2022; HU et al., 2013; LI et al., 2022), mas esse não afeta a expressão proteica de BMP-9, mas atua sobre a via de sinalização de BMPs aumentando a expressão gênica de *Bmp-2*, do receptor *Bmpr1a*, da *Smad1* e do fator de transcrição *Hey-1*. Esses resultados sugerem que a Hipóxia ativa a via de sinalização de BMPs como um todo, aqui avaliada somente a via canônica, incluindo mecanismos de regulação, no caso representado pelo fator de transcrição HEY-1, que é repressor da diferenciação osteoblástica e cujo aumento talvez explique a não modificação na expressão do fator de transcrição osteogênico RUNX2 (ZENG

et al., 2015). No entanto, esses resultados são preliminares e futuras investigações devem ser realizadas para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da Hipóxia nas vias de BMPs.

Considerando as abordagens terapêuticas, o uso de moléculas secretadas por células pode ser vantajoso em comparação com as próprias células, tornando o meio condicionado, que contém seu secretoma, mais seguro, pois excluem algumas preocupações com o uso das células, tais como destino, tempo de permanência, distribuição, enxertamento e outros (HERBERTS; KWA; HERMSEN, 2011), além de ser facilmente preparada e permitir armazenamento a longo prazo (MEHANNA et al., 2015). Corroborando com isso, dados não publicados do nosso grupo mostram que a injeção de meio condicionado por MSCs^{BMP-9+} induz maior formação óssea em defeitos de calvária de camundongos do que a injeção das MSCs^{BMP-9+} (ROBSON DIEGO CALIXTO, informação pessoal).

Assim, com vistas ao uso futuro em terapias para regenerar tecido ósseo, avaliamos o efeito do secretoma de MSCs^{BMP-9+}, contido no meio condicionado por elas submetidas à Hipóxia (MC Hipóxia), em MSCs da medula óssea e osteoblastos da linhagem MC3T3-E1. Em geral, esse meio condicionado não afetou a viabilidade celular, mas acelerou a migração celular e a diferenciação osteoblástica de ambas as linhagens celulares, indicando os efeitos estimulantes da associação de Hipóxia e BMP-9 no potencial osteogênico dessas células. Interessante observar que, em relação à migração o efeito do MC Hipóxia foi mais intenso nas MSCs, com aumento na migração de quase 200% vezes em comparação com o MC Controle enquanto a migração de MC3T3-E1 foi aumentada apenas 14%. Por outro lado, o efeito do MC Hipóxia na diferenciação osteoblástica foi mais evidente em MC3T3-E1 do que em MSCs porque foi detectada em quase todos os ensaios realizados.

Dentre os vários componentes do secretoma celular, que inclui proteínas solúveis, ácidos nucleicos livres, lipídeos e vesículas extracelulares (VIZOSO et al., 2017), neste estudo foi avaliada somente a expressão de um painel de proteínas incluindo citocinas, fatores de crescimento e proteases, que revelou regulação negativa pela Hipóxia da expressão de somente 7 das 34 proteínas avaliadas. As proteínas moduladas negativamente foram BFGF, ICAM-1, IGFBP-2, IGF-1, I-TAC, LUNGKINE e TIMP-2, que corrobora com alguns estudos que também sugerem a regulação negativa mediada por hipóxia dessas proteínas.

BFGF é conhecida por inibir a indução de diferenciação por proteínas morfogenéticas ósseas, um mecanismo que provavelmente limita a ação de BMPs em osteoblastos (PEREIRA; ECONOMIDES; CANALIS, 2000). Conseqüentemente, sua inibição explica, ao menos em parte, o aumento da diferenciação osteoblástica induzido pelo MC Hipóxia. ICAM-1 é mais

expresso em normóxia (KAWCZYK-KRUPKA et al., 2017; WILLAM et al., 1999) demonstrando uma regulação negativa dependente de HIF-1 fornecendo uma resposta adaptativa a estímulos pró-inflamatórios durante a Hipóxia celular (NARRAVULA; COLGAN, 2001) e evidências crescentes demonstram que mediadores pró-inflamatórios de tecidos lesados suprimem a diferenciação osteogênica e prejudicam a formação óssea e que a expressão de ICAM-1 prejudicou a diferenciação osteogênica de MSCs (XU et al., 2014).

Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, o MC coletado sob condições de Hipóxia influenciou a regeneração óssea por meio do aumento da migração e adesão de MSCs endógenas, onde as habilidades de migração e adesão celular foram aumentadas através da superexpressão de ICAM-1 no grupo tratado com MC submetido à Hipóxia, bem como o MC coletado sob condições de hipóxia favoreceu a osteogênese *in vivo*. Esses resultados sugerem que a regulação negativa de ICAM-1 sob condições de Hipóxia pode ser responsável por mudanças comportamentais em MSCs endógenas favorecendo a osteogênese *in vivo* sendo um potencial importante para tratamento de defeitos ósseos críticos (CHANG et al., 2015).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina IGFBP-2 e IGF-1 também apresentam uma regulação negativa em ambientes de Hipóxia, onde foi demonstrado que a Hipóxia leva a alterações na expressão de IGFBP-2 (AL QAHTANI; HOLLY; PERKS, 2017) e sua regulação negativa mediado por inibidores da sinalização JNK ou AKT reduz drasticamente a diferenciação adipogênica mediada por IGFBP-2 (WANG et al., 2017). IGF-1 está diretamente relacionado com uma ampla variedade de atividades biológicas, como o desenvolvimento de células somáticas, diferenciação celular, atividade neuronal cortical, regulação do desenvolvimento cerebral e está envolvido, direta e indiretamente, na longevidade e regulação endócrina (AL-SAMERRIA; RADOVICK, 2021), bem como a resposta migratória em MSCs (LI et al., 2007).

A Hipóxia é um componente presente do microambiente do tumoral, e um dos sistemas que podem ser afetados pela hipóxia é o sistema de quimiocinas, LUNGKINE é responsável por promover aumento da expressão das quimiocinas CXC e dos receptores de quimiocinas CXC na normóxia, (KORBECKI et al., 2021) então a diminuição da expressão de algumas proteínas favorece a não formação de um microambiente tumoral. A Hipóxia também reduz a expressão TIMP-2 e níveis baixos de TIMP-2 também são responsáveis por um aumento na migração e proliferação de células endoteliais, favorecendo uma ação pró-angiogênica (LAHAT et al., 2011).

A literatura não mostra uma participação I-TAC nos fenômenos biológicos aqui investigados, mas tais efeitos observados nas proteínas que foram reguladas negativamente também podem ser atribuídos ao tempo de permanência de Hipóxia, bem como as variações de concentrações em que essas células podem ser submetidas, pois esses parâmetros influenciam atividades fisiológicas, bem como podem variar o tempo de fosforilação de diversas proteínas (KAKUDO et al., 2015; KORBECKI et al., 2021), no entanto, esses resultados são preliminares e futuras investigações devem ser realizadas para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da duração da Hipóxia nas moléculas secretadas no meio condicionado.

Nesse estudo demonstramos que a Hipóxia pode ser induzida em MSCs^{BMP-9+} por CoCl₂ na concentração de 40 µM por 3 dias, que regula a via de sinalização de BMPs sem afetar a expressão de BMP-9 e que o secretoma derivado dessas células cultivadas aumenta a migração e a diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos. Esses resultados indicam que o uso de MSCs^{BMP-9+} condicionadas por Hipóxia ou seu secretoma podem ser abordagens baseadas em células a serem investigadas como terapias para regenerar defeitos ósseos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- A exposição de MSCs^{BMP-9+} ao CoCl₂ na concentração de 40 µM por 3 dias induz Hipóxia, como revelado pelo aumento na expressão proteica de HIF-1α e gênica de *Glut1* e *Vegfa*.
- A Hipóxia estimula a via de BMPs pelo aumento na expressão gênica de *BMP-2* e seus alvos.
- O secretoma de MSCs^{BMP-9+} em Hipóxia estimula a migração e diferenciação osteoblástica de MSCs e osteoblastos.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHO, L. F. et al. Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. **Regenerative Medicine**, v. 17, n. 6, p. 341–353, jun. 2022.

AL QAHTANI, A.; HOLLY, J.; PERKS, C. Hypoxia negates hyperglycaemia-induced chemoresistance in breast cancer cells: the role of insulin-like growth factor binding protein 2. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 74635–74648, 26 set. 2017.

AL-SAMERRIA, S.; RADOVICK, S. The Role of Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) in the Control of Neuroendocrine Regulation of Growth. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2664, 5 out. 2021.

AMIR, M. S. et al. HIF-1 α plays an essential role in BMP9-mediated osteoblast differentiation through the induction of a glycolytic enzyme, PDK1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 237, n. 4, p. 2183–2197, abr. 2022.

BALDARI, S. et al. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2087, 2 out. 2017.

BEFANI, C. et al. Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 11, p. 2359–2368, nov. 2013.

BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 12, p. 1329–1343, dez. 2010.

CHANG, W. et al. Enhanced Healing of Rat Calvarial Bone Defects with Hypoxic Conditioned Medium from Mesenchymal Stem Cells through Increased Endogenous Stem Cell Migration via Regulation of ICAM-1 Targeted-microRNA-221. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 7, p. 643–650, jul. 2015.

CHEN, L. et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. **PloS One**, v. 9, n. 4, p. e96161, 2014.

CHENG, H. et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**, v. 85, n. 8, p. 1544–1552, ago. 2003.

CRISOSTOMO, P. R. et al. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 294, n. 3, p. C675-682, mar. 2008.

DAS, R. et al. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 2, p. 159–168, abr. 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006.

FREITAS, G. P. et al. Cell Therapy: Effect of Locally Injected Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow or Adipose Tissue on Bone Regeneration of Rat Calvarial Defects. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13476, 17 set. 2019a.

FREITAS, G. P. et al. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. **Regenerative Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1107–1119, dez. 2019b.

FREITAS, G. P. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing BMP-9 by CRISPR-Cas9 present high in vitro osteogenic potential and enhance in vivo bone formation. **Gene Therapy**, v. 28, n. 12, p. 748–759, dez. 2021.

GOODMAN, S. B.; LIN, T. Modifying MSC Phenotype to Facilitate Bone Healing: Biological Approaches. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 641, 2020.

GUNTUR, A. R.; ROSEN, C. J. Bone as an Endocrine Organ. **Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 18, n. 5, p. 758–762, 2012.

HERBERTS, C. A.; KWA, M. S. G.; HERMSEN, H. P. H. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 29, 22 mar. 2011.

HSU, S.-H.; CHEN, C.-T.; WEI, Y.-H. Inhibitory effects of hypoxia on metabolic switch and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 12, p. 2779–2788, dez. 2013.

HU, N. et al. BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 2, p. 532–541, 15 jan. 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAKUDO, N. et al. Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 α Activation. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0139890, 2015.

KAWCZYK-KRUPKA, A. et al. The effect of ALA-PDT under normoxia and cobalt chloride (CoCl₂)-induced hypoxia on adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) secretion by colorectal cancer cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 103–115, set. 2017.

KIM, D. S. et al. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Stress & Chaperones**, v. 21, n. 6, p. 1089–1099, nov. 2016.

KORBECKI, J. et al. The Effect of Hypoxia on the Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 843, 15 jan. 2021.

LAHAT, N. et al. Reduced TIMP-2 in hypoxia enhances angiogenesis. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 300, n. 3, p. C557-566, mar. 2011.

LEE, B.-C.; KANG, K.-S. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 397, 14 set. 2020.

- LENNON, D. P.; EDMISON, J. M.; CAPLAN, A. I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, n. 3, p. 345–355, jun. 2001.
- LI, Y. et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 3, p. 780–784, 11 maio 2007.
- LI, Y. et al. HIF1 α Promotes BMP9-Mediated Osteoblastic Differentiation and Vascularization by Interacting with CBFA1. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 2475169, 2022.
- LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIN, W. et al. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 9, p. 19–27, abr. 2017.
- LIU, W. et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126. **Acta Biomaterialia**, v. 103, p. 196–212, fev. 2020.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONGONI, A. et al. The impact of immune response on endochondral bone regeneration. **NPJ Regenerative medicine**, v. 3, p. 22, 2018.
- MAJORS, A. K. et al. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 15, n. 4, p. 546–557, jul. 1997.
- MEHANNA, R. A. et al. The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 846062, 2015.
- MERIMI, M. et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 661532, 2021.

MOHYELDIN, A.; GARZÓN-MUVDI, T.; QUIÑONES-HINOJOSA, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2, p. 150–161, 6 ago. 2010.

MUÑOZ-SÁNCHEZ, J.; CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 39, n. 4, p. 556–570, abr. 2019.

NARRAVULA, S.; COLGAN, S. P. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 166, n. 12, p. 7543–7548, 15 jun. 2001.

NIU, X. et al. Hypoxia regulates angiogenic-osteogenic coupling process via up-regulating IL-6 and IL-8 in human osteoblastic cells through hypoxia-inducible factor-1 α pathway. **Cytokine**, v. 113, p. 117–127, jan. 2019.

NORONHA, N. DE C. et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 131, 2 maio 2019.

PEREIRA, R. C.; ECONOMIDES, A. N.; CANALIS, E. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. **Endocrinology**, v. 141, n. 12, p. 4558–4563, dez. 2000.

QUADE, M. et al. The Secretome of Hypoxia Conditioned hMSC Loaded in a Central Depot Induces Chemotaxis and Angiogenesis in a Biomimetic Mineralized Collagen Bone Replacement Material. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 2, p. e1901426, jan. 2020.

RASMUSSEN, J. G. et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. **Cytotherapy**, v. 13, n. 3, p. 318–328, mar. 2011.

RAZIYEVA, K. et al. Preconditioned and Genetically Modified Stem Cells for Myocardial Infarction Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7301, 2 out. 2020.

REZAEI, A. et al. Hypoxia mimetics restore bone biomineralisation in hyperglycaemic environments. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 13944, 17 ago. 2022.

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

SCHROEDER, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC molecular biology**, v. 7, p. 3, 31 jan. 2006.

SOUZA, A. T. P. et al. Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. **Cytotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1267–1277, out. 2018.

SOUZA, A. T. P. et al. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 38, n. 4, p. 481–490, jul. 2020.

TETI, G. et al. The Hypoxia-Mimetic Agent Cobalt Chloride Differently Affects Human Mesenchymal Stem Cells in Their Chondrogenic Potential. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 3237253, 2018.

TOBERER, F. et al. Metabolic reprogramming and angiogenesis in primary cutaneous Merkel cell carcinoma: expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its central downstream factors. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 35, n. 1, p. 88–94, jan. 2021.

VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.

WALMSLEY, G. G. et al. Stem Cells in Bone Regeneration. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 12, n. 5, p. 524–529, out. 2016.

WANG, Y. et al. IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0184182, 2017.

WILLAM, C. et al. Increases in oxygen tension stimulate expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 6, p. H2044–2052, jun. 1999.

WU, D.; YOTNDA, P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 54, p. 2899, 12 ago. 2011.

XU, F.-F. et al. Intercellular adhesion molecule-1 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and impairs bio-scaffold-mediated bone regeneration in vivo. **Tissue Engineering. Part A**, v. 20, n. 19–20, p. 2768–2782, out. 2014.

YU, X. et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, enhances bone marrow mesenchymal stem cells migration and osteogenic differentiation via STAT3 signaling pathway. **Cell Biology International**, v. 42, n. 10, p. 1321–1329, set. 2018.

YU, X. et al. Cellular hypoxia promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and bone defect healing via STAT3 signaling. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 24, p. 64, 2019.

ZENG, Z. et al. Cyclic stretch enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation through the inhibition of Hey1. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 5, p. 1273–1281, nov. 2015.

ZHENG, J. et al. CircCDK8 regulates osteogenic differentiation and apoptosis of PDLSCs by inducing ER stress/autophagy during hypoxia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1485, n. 1, p. 56–70, fev. 2021.