

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA GUARALDO CAMPOS TÓTOLI

**EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA
MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSE NA REGENERAÇÃO DO TECIDO
ÓSSEO**

RIBEIRÃO PRETO

2020

GABRIELA GUARALDO CAMPOS TÓTOLI

**EFEITO DA TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO NA
REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

RIBEIRÃO PRETO

2020

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Tótolli, Gabriela Guaraldo Campos

Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do tecido ósseo. Ribeirão Preto, 2020.

63p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÓTOLI, Gabriela Guaraldo Campos

Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do tecido ósseo.

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

Programa: Biologia Oral

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

À Adriana, Gustavo, Rafaela e Flávio

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Adalberto Luiz Rosa, pela oportunidade e honra de estar inserida neste grupo de pesquisa incrível, por me proporcionar a grandeza dessa orientação impecável, pela confiança em minha dedicação e trabalho, pela convivência amistosa e alegre, por todo aprendizado que me proporcionou e principalmente por não ter desistido de mim. Meu máximo respeito e admiração. Minha gratidão é eterna.

Ao Professor Dr. Márcio Mateus Beloti, pela sublime arte da gentileza e educação, pela troca de conhecimentos extraordinária e pela grandiosidade e humildade de me permitir usufruir de tanto aprendizado transmitido. Meu enorme respeito, admiração e carinho. Obrigada por tudo.

A Professora Dra. Emanuela Prado Ferraz, por abrir para mim as portas do vasto universo que existia além de tudo que eu mais sonhava e almejava, por acreditar em mim cada segundo, por me proporcionar as primeiras oportunidades desse mundo acadêmico incrível, por toda confiança e amor transmitidos em cada ensinamento e persistência, por nunca ter desistido de mim, por tudo que fez por e para mim durante anos de graduação que me fizeram chegar até aqui. Você representa muito mais do que imagina nesta conquista e escrevo isso com um coração cheio de gratidão, amor, respeito, carinho e felicidade. Obrigada por tudo, obrigada por tanto. Você sempre terá um lugar especial em meu coração e em meus pensamentos. Gratidão eterna.

A todo corpo docente, pesquisadores, funcionários e técnicos da Universidade de Franca – UNIFRAN e dos Laboratórios de Química Inorgânica e de Matérias (Sol-Gel), de Mutagênese e de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA), em especial, ao Prof. Dr. Antônio Carlos Pereira Gomes, Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Profa. Dra. Denise Crispim Tavares, Prof. Dr. Eduardo José Nassar, Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz, Prof. Dr. Erick Ricardo Silva, Profa. Dra. Lílian Tedeschi Ramalli, Prof. Dr. Lucas Alonso Rocha e Téc. Lab. Maria Anita Lemos Vasconcelos Ambrósio, pelas oportunidades de trabalho oferecidas durante minha graduação que me ajudaram a chegar até aqui, pelas palavras de força e persistência, por acreditarem em meu potencial e em meus sonhos, por todo aprendizado

transmitido e pela amizade, carinho e respeito. Todos vocês foram essenciais para minhas conquistas. Obrigada por tudo.

Aos meus grandes amigos de graduação e iniciação científica, Aline Maria Vasconcelos, Flávio Nogueira Moreti Oliveira, Jhonatan de Souza Carvallho e Susane Bonamin Moscardini, por tudo durante anos na busca pela construção de um sonho que hoje se torna realidade. Nunca esquecerei de vocês, obrigada por tudo.

A Jovem Pesquisadora Luciana Oliveira Almeida por sempre me tratar como igual e por tanto apoio, carinho, respeito, gentileza e força durante esses anos. Você me fez acreditar em muitos sonhos e me ajudou em vários momentos de desânimo. Obrigada pela amizade, pelas risadas, pelos ensinamentos e conhecimentos difundidos com tanta humildade. Você é um exemplo para todos nós.

Ao Pós-Doutorando Gileade Pereira Freitas por ser meu braço direito na construção e execução deste trabalho, pela riqueza de sua incrível humildade, por tanto conhecimento transmitido, pela força, apoio e carinho nos momentos mais difíceis, por mostrar para mim a sensatez do que realmente importa e por me levantar em muitos momentos de desânimo; pela confiança em meu trabalho, pelas oportunidades geradas e pela amizade construída. Obrigada por tudo. Gratidão e respeito sublimes à você, sempre.

A Pós-Doutoranda Helena Bacha Lopes por tantos ensinamentos durante esses anos, por representar grande parte da minha evolução pessoal e profissional e por acreditar em mim. Nunca esquecerei a influência que você exerceu em minha garra durante esses anos. Obrigada pelas risadas e pelo carinho, sempre. Levo você em meu coração.

A Doutoranda Rayana Longo Bighetti Trevisan por ser simplesmente meu maior exemplo de trabalho impecável dentro dos laboratórios, por ter me ensinado a base de tudo que foi sendo construído ao longo desses anos, por ter me recebido e acolhido de braços abertos, por estar comigo nos momentos mais difíceis, pelas alegrias, risadas, brincadeiras e por todo carinho, respeito, companheirismo, lealdade e amizade construídas ao longo desses anos. Obrigada por tudo que fez por mim e ainda faz. Obrigada por representar

grande parte de tudo isso, mesmo longe, você sempre esteve em meu coração. Gratidão por tudo, principalmente por esse amizade que quero levar para vida toda.

Ao Doutorando Alann Thaffarell Portilho de Souza por sempre estar disposto a ajudar, pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, pelos momentos compartilhados de alegria e superação, por ser um exemplo para todos dentro do laboratório e pelas oportunidades de aprendizado que me proporcionou ao longo desses anos. Obrigada por tudo.

Aos grandes amigos e companheiros de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado que fizeram grande parte de toda construção deste trabalho, pela amizade, pelas risadas, pela força e apoio nos momentos de desânimo e por toda ajuda concedida durante a execução deste trabalho, Ana Carolina Loyola Barbosa, Antônio Secco Martorono, Denise Weffort, Georgia Kors Quiles, Isabella Cristine dos Santos, José Bernardo de Santis, Júlia Lima de Oliveira, Letícia Faustino Adolpho, Maria Paula Oliveira Gomes, Paola Gomes Souza, Rafaella Da Cruz Polizelli Scannavino, Renata Klemp Orlandini, Rodrigo Paolo Flores Abuna e Thaís Moré Milan.

As queridas Adriana Luísa Gonçalves de Almeida e Fabíola Singaretti de Oliveira, vocês me abraçaram deste o início desta jornada de uma maneira singular, não tenho palavras para descrever aqui toda gratidão que tenho a vocês por tanto que fizeram por mim, por todo carinho, amor, amizade e alegrias transmitidas e construídas. Obrigada por sempre estarem comigo, por tanto conhecimento compartilhado, pela paciência, dedicação, cuidado e principalmente por me levantarem nos momentos difíceis, vocês estarão para sempre em meu coração. Gratidão por tudo.

A todos os funcionários e técnicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP – USP, em especial, aos amigos, Aparecida Dulce de Oliveira Negreti, Carla Daniela Lima da Silva, Imaculada Jainaira Miguel, Esp. Lab. Luiz Gustavo de Souza, Téc. Lab. Milla Sprone Tavares, Esp. Lab. Paulo Batista De Vasconcelos, Rafael Angelo Lascala Femineli, Raphael Martini Vicente e Téc. Lab. Roger Rodrigo Fernandes, que sempre se dispuseram a me ajudar, em qualquer instância e situação, por toda paciência, dedicação e

os vastos conhecimentos transmitidos aos quais foram muito importantes para a realização desse trabalho.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro durante a realização desse projeto.

Aos meus pais, Adriana Guaraldo Campos Tótolli, Gustavo Tótolli e minha querida irmã, Rafaela Guaraldo Campos Tótolli por serem o alicerce mais constante e seguro nesta jornada, por tudo que fizeram por mim, por estarem comigo sempre e por acreditarem em mim. Vocês são tudo em minha vida e sem vocês nada seria possível. Essa vitória é nossa, amo vocês eternamente.

A toda minha família pelos pensamentos positivos, apoio, orgulho, carinho e amor transmitidos durante esses anos, vocês são incríveis e eu tenho a grande sorte de fazer parte desta grandeza. Obrigada por tudo.

As minhas avós Elza Guaraldo Campos e Irma Ribeiro Tótolli por serem minhas maiores fontes de amor, sabedoria, respeito, honestidade, lealdade, gratidão, reconhecimento, persistência, fé, força e coragem na construção desses anos de mestrado. Vocês são meus maiores exemplos de tudo de mais maravilhoso que existe neste vida terrena. Amo vocês, eternamente.

Aos meus queridos sogros, Lídia Helena Bassi e Paulo Antônio Vieira por anos de amizade, respeito, carinho e apoio. Vocês sempre estiveram comigo em cada etapa da jornada dando suporte e força. Sou grata e tenho muita sorte de tê-los em minha vida. Obrigada por tudo.

Ao grande amor da minha vida, Flávio Augusto Bassi Vieira. Por ser meu maior ponto de refúgio, carinho, segurança e ajuda durante esses anos e por tantos juntos. Vocês é minha maior fonte de inspiração e força. Obrigada por me colocar para frente, por me levantar e por ser meu grande amigo, companheiro e por sempre me fazer acreditar neste sonho. Sem você tudo seria mais difícil. Amo você, imensamente.

Sem todos vocês nada disso seria possível, muito obrigada.

RESUMO

TÓTOLI, GGC. Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do tecido ósseo. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2020. 63p.

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que apresenta eminente capacidade de reparo, entretanto, em algumas situações a extensão da lesão impede o reparo total deste tecido, sendo este um dos grandes desafios da Odontologia e Medicina. Deste modo, a terapia celular fundamentada na utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs) tem se apresentado como uma alternativa promissora. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que CTMs obtidas de tecido adiposo (CTMs-TA) apresentam perfil gênico mais relacionado à angiogênese, enquanto as CTMs de medula óssea (CTMs-MO) apresentam perfil gênico mais relacionado à osteogênese. Como ambos os processos são fundamentais para se obter a regeneração óssea, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da terapia celular baseada em injeções de CTMs-MO e CTMs-TA sobre a formação óssea. Para isso, CTMs-MO obtidas de fêmures e CTMs-TA, da gordura inguinal de ratos foram selecionadas por adesão ao plástico de cultura e caracterizadas como CTMs pela expressão de um painel de marcadores de superfície e a diferenciação nas linhagens osteoblástica e adipocítica. Para avaliar a regeneração do tecido ósseo, defeitos de 5 mm de diâmetro foram criados em calvárias de ratos que foram tratados com injeções locais de CTMs-MO após duas semanas e CTMs-TA após seis semanas da criação dos defeitos ou CTMs-TA e CTMs-MO, respectivamente. Animais controle receberam duas injeções de veículo (PBS) nos mesmos períodos. Oito semanas após a primeira injeção, os animais foram eutanasiados e a formação do tecido ósseo foi avaliada por

microtomografia computadorizada e análise histológica. Os dados foram comparados por ANOVA, seguido do teste de Tukey, ou teste t, quando apropriado, considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). As células aderiram ao plástico de cultura com morfologia fibroblastóide, exibiram alta porcentagem de células expressando os marcadores de superfície CD29 e CD90 e baixa porcentagem de células expressando os marcadores CD31, CD34 e CD44, e diferenciação osteoblástica e adipocítica, confirmando serem CTMs. As análises microtomográficas e histológicas mostraram que as injeções locais de CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO resultaram em maior formação óssea em comparação com os defeitos que não receberam células. Esses resultados apontam que a terapia celular baseada em injeções locais de CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO é efetiva para induzir significativa formação óssea.

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

ABSTRACT

TOTOLI, GGC. **Effect of cell therapy with bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells on bone tissue regeneration.** Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2020. 63p.

Bone tissue is a specialized connective tissue that has an imminent repair capacity, however, in some situations, the extension of the lesion prevents the total repair of this tissue, which is one of the great challenges in Dentistry and Medicine. Thus, cell therapy based on the use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been a promising alternative. Recently, our research group reported that adipose tissue MSCs (AT-MSCs) have a gene profile more related to angiogenesis, while bone marrow MSCs (BM-MSCs) have one more related to osteogenesis. As both processes are fundamental to obtain bone regeneration, the aim of the present study was to evaluate the potential of cell therapy based on injections of BM-MSCs and AT-MSCs on bone formation. For that, BM-MSCs from femurs and AT-MSCs from inguinal fat of rats were selected by adherence to the culture plastic and characterized as MSCs by the expression of a panel of surface markers and the differentiation in osteoblastic and adipocytic lineages. To assess bone tissue regeneration, 5-mm defects were created in rat calvaria and treated with local injections of BM-MSCs after two weeks and AT-MSCs after six weeks of their creation or AT-MSCs and BM-MSCs, respectively. Eight weeks after the first injection, the animals were euthanized and bone formation was evaluated by computerized microtomography and histological analyses. The data were compared by ANOVA, followed by the Tukey test, or t test, when appropriate, and the significance level was set at 5% ($p \leq 0.05$). The cells adhered to culture plastic with fibroblastoid morphology, exhibited high percentage of cells expressing CD 29 and CD90 and low percentage expressing CD31, CD34 and CD44, in addition to differentiate into osteoblasts and adipocytes, confirming being MSCs. Microtomographic and histological analyses showed that calvaria defects treated with local injections of BM-MSCs/AT-MSCs or AT-MSCs/BM-

MSCs presented greater bone formation compared to defects treated without cells. These results indicated that cell therapy based on local injections of BM-MSCs/AT-MSCs or AT-MSCs/BM-MSCs is effective in inducing meaningful bone formation.

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** CTMs aderidas ao plástico de cultura. CTMs-MO aos 3 (A) e 6 dias (B) e CTMs-TA aos 3 (C) e 6 dias (D). Barra de escala: A e C= 100 µm; B e D= 120 µm.....32
- Figura 2.** Matriz extracelular mineralizada produzida por CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio osteogênico por 21 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=5). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,003).....34
- Figura 3.** Acúmulo lipídico produzido por CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio adipogênico por 17 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=5). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,001).....35
- Figura 4.** Reconstruções 3D geradas por µCT e parâmetros morfométricos da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com de injeção local de solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem células (Controle - A), CTMs-MO/CTMs-TA (B) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C) em 8 semanas (n=12). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p≤0,05). Barra de escala: A–C= 1 mm.....37
- Figura 5.** Fotomicrografia por microscopia de luz dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem células (Controle - A e D), CTMs-MO/CTMs-TA (B e E) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C e F) em 8 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com CTMs-MO/CTMs-TA (B e E) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C e F) observou-se formação de tecido ósseo, os defeitos Controle (A e D) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). tc: tecido conjuntivo; vs: vaso sanguíneo; ot: osteócito. Barra de escala: A–C= 1,25 mm; D–F= 100 µm.....39
- Figura 6.** Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de PBS (Controle) em 8 semanas (n=11). Barra = 1 mm.57

Figura 7. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO/CTMs-TA em 8 semanas (n=11). Barra = 1 mm.....	58
Figura 8. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-TA/CTMs-MO em 8 semanas (n=10). Barra = 1 mm.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos dos defeitos de calvária de ratos com injeções 2 e 6 semanas após a criação dos defeitos de PBS, CTMs-MO ou CTMs-TA.....	28
Tabela 2. Porcentagem de CTMs-MO e de CTMs-TA expressando marcadores de superfície	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO GERAL	22
2.1 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 EXPERIMENTOS IN VITRO	23
3.1.1 Obtenção e cultura de células	23
3.1.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO	23
3.1.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA	24
3.1.2 Caracterização das culturas celulares	25
3.1.2.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA	25
3.1.2.1.1 Aderência ao plástico	25
3.1.2.1.2 Expressão de marcadores de superfície	25
3.1.2.2 Diferenciação osteoblástica e adipocítica das CTMs-MO e CTMs-TA.....	26
3.1.2.2.1 Formação e quantificação de matriz extracelular mineralizada.....	26
3.1.2.2.2 Formação e quantificação de acúmulo lipídico.....	27
3.2 EXPERIMENTOS IN VIVO.....	27
3.2.1 Procedimento cirúrgico para criação de defeitos ósseo	27
3.2.2 Tratamento dos defeitos ósseos	28
3.2.3 Análise microtomográfica e morfométrica (μ CT)	29
3.2.4 Análise Histológica	30
3.2.5 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterização das culturas celulares	31
4.1.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA.....	31
4.1.1.1 Aderência ao plástico	31
4.1.1.2 Expressão dos marcadores de superfície	32
4.1.2 Diferenciação osteoblástica e adipocítica das CTMs-MO e CTMs-TA.....	33
4.1.2.1 Formação e quantificação de matriz extracelular mineralizada.....	33
4.1.2.2 Formação e quantificação de acúmulo lipídico	34

4.2 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO ou CTMs-TA por μCT	36
4.3 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO ou CTMs-TA por análise histológica.....	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A	57
ANEXO B	58
ANEXO C.....	59
ANEXO D	60

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que apresenta capacidade de regeneração quando lesado por traumas, infecções ou neoplasias. É formado por células e matriz extracelular mineralizada que estão envolvidas no desenvolvimento e homeostase do tecido ósseo, regulando a remodelação óssea, que é a constante deposição e reabsorção (Grayson et al., 2015; Meguid et al., 2017; Orciani et al., 2017). Apesar desta capacidade de regeneração, dependendo da natureza e da extensão do dano, bem como das condições locais e sistêmicas, a regeneração do tecido é comprometida, conforme relatado em 10% a 20% das fraturas traumáticas (Brydone et al., 2010; Feigenson et al., 2019; Iaquina et al., 2019; Longoni et al., 2018; Lu et al., 2019; Tawonsawatruk et al., 2016; Zwingenberger et al., 2012).

Na tentativa de alcançar o completo reparo e regeneração do tecido ósseo são necessárias intervenções, dentre elas, aquelas nas quais se utilizam enxertos, sendo eles autógenos, alógenos e aloplásticos. Apesar do relativo sucesso desses tratamentos, o uso de enxertos está associado a problemas como quantidade limitada de enxerto, morbidade, necessidade de mais de uma área cirúrgica e possibilidade de transmissão de doenças (Fernandes et al., 2016; Freitas et al., 2019a; Grayson et al., 2015; Killington et al., 2018; Liu et al., 2020; Longoni et al., 2018; Oryan et al., 2014; Tsiapalis et al., 2020; Xie et al., 2017). Por fim, nenhum biomaterial até o momento pode ser completamente aceito como uma alternativa ideal devido à baixa habilidade de osteocondução, osteoindução e osteogênese (Bigham-Sadegh et al., 2015; Oryan et al., 2017). Com o intuito de buscar novas formas de tratamento desses defeitos ósseos a medicina regenerativa baseada apenas no uso de células têm atraído a atenção da comunidade científica com os avanços em pesquisa na terapia celular como uma estratégia promissora para alcançar o completo reparo ósseo (Freitas et al., 2019a; Freitas et al., 2019b; Gaubys et al., 2018; Oryan et al., 2017; Souza et al., 2018; Souza et al., 2020; Trohatou et al., 2017).

O crescente interesse pelo uso de células iniciou-se a partir dos estudos liderados pelo grupo de Alexander Friedenstein, nas décadas de 1960 e 1970 (Friedenstein et al., 1966; Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1976; Grayson et al., 2015; Murphy et al., 2013; Pittenger et al., 2019), que verificaram a presença de uma subpopulação de células-tronco

mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea que se distinguia das demais pela sua capacidade de aderência ao plástico, formação de colônias fibroblásticas e potencial de diferenciação osteogênica, que é crucial para criação do microambiente ou nicho hematopoiético que influencia no processo de reparo de fraturas ósseas (Bianco et al., 2008; Kfoury et al., 2015; Oryan et al., 2017; Spees et al., 2016; Taguchi et al., 2005; Zhao et al., 2016).

As CTMs são células indiferenciadas, não hematopoiéticas de derivação mesodérmica que apresentam notável capacidade de auto renovação, proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens, incluindo as osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (Killington et al., 2018; Meguid et al., 2017; Nancarrow-Lei et al., 2017; Salami et al., 2018; Zhou et al., 2020). Essas células afetam o microambiente circundante migrando para sítios de lesão e, uma vez alojadas, são capazes de recrutar outras células osteoprogenitoras através de mecanismos autócrinos e parácrinos (Brown et al., 2019; Shyam et al., 2017; Spees et al., 2016). Elas não induzem respostas imunes devido à baixa expressão dos complexos de histocompatibilidade (MHC) I e II (Han et al., 2019; Murphy et al., 2013; Watanabe et al., 2016; You et al., 2019) e têm efeitos imunomodulatórios porque inibem tanto a atividade quanto a proliferação das células exterminadoras naturais e linfócitos B, suprimem a proliferação de linfócitos T e a maturação de células dendríticas mielóides (Bruno et al., 2015; Gao et al., 2016; Harrell et al., 2020; Salami et al., 2018). Também atuam de maneira direta e indireta sobre as células inflamatórias, resultando na diminuição da produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , e no aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Asami et al., 2013; Grayson et al., 2015; Kovach et al., 2015), além de estimular a angiogênese, efeito anti-apoptótico e antioxidante (Brown et al., 2019; Harrell et al., 2020; Kachgal et al., 2011; Manieri et al., 2015; Smadja et al., 2012; Tögel et al., 2007). Dessa forma, as interações que as CTMs estabelecem com as células pelo contato direto e indireto, pela secreção de citocinas e fatores solúveis, estimulam a capacidade de *homing* dessas células alterando o microambiente, tornando-o favorável à regeneração tecidual (Brown et al., 2019; Caplan., 2007; Horwitz et al., 2006; Nancarrow-Lei et al., 2017; Oryan et al., 2017; Spees et al., 2016).

As CTMs podem ser obtidas de diferentes tecidos, mas a medula óssea (CTMs-MO) e o tecido adiposo (CTMs-TA) são as fontes mais exploradas para

finalidades terapêuticas. A medula óssea foi a primeira e é a principal fonte de obtenção e aplicação clínica e experimental dessas células, devido ao seu alto caráter proliferativo e capacidade de diferenciação osteogênica, sendo eficaz para o processo de regeneração óssea (laquinta et al., 2019; Liu et al., 2020; You et al., 2019). No entanto, a percentagem de CTMs encontrada na medula óssea é baixa e variável, além de exigir uma técnica de coleta invasiva (Brown et al., 2019; laquinta et al., 2019). Diferentemente da medula óssea, o tecido adiposo é uma fonte abundante, de fácil e simples remoção, com menor risco e desconforto ao paciente (Brown et al., 2019; laquinta et al., 2019; Xu et al., 2017). É importante ressaltar que o processamento, manipulação, composição do meio e do nicho original destas CTMs influenciam consideravelmente na qualidade, quantidade e no potencial de diferenciação destas células (Brown et al., 2019; Sanghani-Kerai et al., 2018). Independente do nicho, ambas as CTMs exibem os três critérios estabelecidos pelo comitê de Células-Tronco e do Tecido Mesenquimal e da Sociedade Internacional de Terapia Celular para sua caracterização (Brown et al., 2019; Cho et al., 2017), que são: 1) adesão ao plástico de cultura de células apresentando morfologia fibroblástóide; 2) alta porcentagem de células expressando marcadores de superfície, tais como CD73, CD90 e CD105 dentre outros, combinado com baixa porcentagem de células expressando os marcadores CD14, CD34 e CD45; e 3) capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* incluindo osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici et al., 2006).

Ambas as CTMs, CTMs-MO e CTMs-TA, apresentam diferenciação osteoblástica e adipocítica (Abuna et al., 2016; Kern et al., 2006; Peng et al., 2008; Rebelatto et al., 2008). Entretanto, não há consenso entre os vários estudos que mostram ou um maior potencial de diferenciação tanto osteoblástica quanto adipocítica de CTMs-TA em comparação às CTMs-MO, ou que ambas as CTMs assemelham-se em suas diferenciações osteoblástica e adipocítica (Kern et al., 2006; Rebelatto et al., 2008). Em CTMs de ratos, nosso grupo de pesquisa verificou que em CTMs-MO houve favorecimento da diferenciação osteoblástica, enquanto CTMs-TA apresentaram maior diferenciação adipocítica (Abuna et al., 2016), corroborando com os resultados apresentados por Peng et al (2008). Sob as mesmas condições de cultura, foi observada maior expressão de mRNA e de proteína de marcadores ósseos, assim como maior formação de matriz extracelular mineralizada nas CTMs-

MO em comparação às CTMs-TA (Abuna et al., 2016). No entanto, a despeito dessas diferenças em seus potenciais de diferenciação, ambas as CTMs estimulam a formação óssea quando utilizadas *in vivo* (Beloti et al., 2012; Freitas et al., 2019a; Semyari et al., 2015) e, portanto, as duas populações celulares são adequadas para investigações envolvendo o uso de células para o tratamento de defeitos ósseos. Mais recentemente, o nosso grupo de pesquisa mostrou que as CTMs-TA apresentaram perfil de expressão gênica mais relacionado com a angiogênese, enquanto as CTMs-MO apresentaram perfil mais osteogênico (Fideles et al., 2018). Corroborando com estudos prévios que mostraram perfil pró-angiogênico das CTMs-TA, além de maior proliferação, capacidade de diferenciação e imunomodulação que as CTMs-MO (Amable et al., 2014; Cho et al., 2017; Sanghani-Kerai et al., 2018). Apesar de CTMs-MO e CTMs-TA apresentarem atividade angiogênica, há evidências de um melhor desempenho das CTMs-TA em terapias de neo-vascularização (Ikegame et al., 2011; Kim et al., 2007; Moon et al., 2006; Rehman et al., 2004; Tang et al., 2004). A combinação de CTMs-MO e CTMs-TA, talvez devido a combinação de suas propriedades osteogênicas e angiogênicas, tem favorecido a formação de tecido ósseo (Kim et al., 2014; Wang et al., 2016).

Diversas metodologias têm sido demonstradas para o implante de CTMs no tratamento de defeitos ósseos através de abordagens de administração sistêmica, por meio de injeção intravascular, ou da aplicação local (Iaquinta et al., 2019). Injeções intravasculares permitem que as CTMs sejam largamente distribuídas por todo corpo utilizando um número mínimo de células necessário para obter um efeito terapêutico (Horwitz et al., 2001). Entretanto, este tipo de administração está relacionado à formação de microêmbolos (Boltze et al., 2015). Um estudo realizando o monitoramento por imagens em tempo real imediatamente e após 48 horas da infusão sistêmica (intra-arterial, intravenosa e na cavidade intraperitoneal) de CTMs em ratos, detectou a presença destas células no pulmão, fígado e em ossos longos (Iaquinta et al., 2019). Em contrapartida, estudos recentes relatam que a injeção local de CTMs é mais eficaz, menos invasiva e segura, uma vez que essas células permanecem por mais tempo no local do defeito melhorando, consideravelmente, o processo de consolidação óssea (Abazari et al., 2019; Huang et al., 2015; Oryan et al., 2017; Wang et al., 2018). É pontuado que tanto a injeção por administração sistêmica ou por administração local promovem a consolidação de fraturas, sendo

mais indicado injeções sistêmicas para fraturas múltiplas e injeção local para lesão unitária (Huang et al., 2015; laquinta et al., 2019).

Em relação à terapia celular é importante ressaltar que, apesar dos inúmeros esforços para avaliar os efeitos terapêuticos em defeitos ósseos de tamanho crítico a maioria apresenta limitações que incluem a exploração restrita do potencial de apenas uma fonte dessas CTMs (Aykan et al., 2013; Liao et al., 2011; Yamada et al., 2004; Yan et al., 2009), avaliação da formação óssea por métodos menos precisos (Liao et al., 2014b), não padronização dos métodos de obtenção dessas células (Brown et al., 2019), o número ideal de células considerando o tamanho dos defeitos (Liao et al., 2014b; Oryan et al., 2017; Young et al., 2014) e implantação dessas células imediatamente após a criação dos defeitos, distanciando sua aplicação clínica.

Considerando todo esse contexto e almejando avaliar a eficácia da terapia celular, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental no qual defeitos ósseos de 5 mm criados em calvária de ratos são tratados por injeção direta de células 2 semanas após a criação dos defeitos (Freitas et al., 2017; Freitas et al., 2019a; Souza et al., 2018). Tal modelo permite mimetizar o tratamento de defeitos ósseos pré-existent e, embora seja pré-clínico, aproxima a terapia celular da prática clínica. Ao avaliarmos o uso de CTMs-TA, CTMs-MO, osteoblastos diferenciados dessas CTMs, osteoblastos derivados de calvária de ratos recém-nascidos e isoladas do osso frontal e parietal observamos significativa formação óssea em todos os defeitos, mas sem ainda atingir a completa regeneração desses defeitos (Freitas et al., 2019a; Freitas et al., 2019b; Souza et al., 2018; Souza et al., 2020).

Tendo em vista o acima exposto, principalmente que CTMs-MO e CTMs-TA apresentam potencial angiogênico e osteogênico, provavelmente as CTMs-MO sendo mais osteogênicas e as CTMs-TA mais angiogênicas, e que o uso de ambas em terapia celular foi igualmente eficaz em induzir formação óssea, mas que estas células permanecem no local onde foram injetadas por menos de 14 dias, nossa hipótese foi que a combinação de injeções de CTMs realizadas com intervalo de 14 dias entre elas poderia regenerar defeitos ósseos de calvária de ratos.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da terapia celular utilizando a combinação de CTMs-MO ou CTMs-TA na indução da completa regeneração de defeitos ósseos.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar as células obtidas da medula óssea e do tecido adiposo como CTMs.
- Avaliar a formação de tecido ósseo após a combinação de injeções locais de CTMs-MO ou CTMs-TA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP (Protocolo N° 2019.1.545.58.9, Anexo A).

3.1 EXPERIMENTOS IN VITRO

3.1.1 Obtenção e cultura de células

3.1.1.1 Obtenção e cultura de CTMs-MO

As CTMs-MO foram obtidas de acordo com o protocolo descrito por (Freitas et al., 2020). Brevemente, ratos machos Sprague-Dawley com 5 semanas de idade e pesando aproximadamente 150 g foram mortos com dose excessiva de Tiopental Sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) via intraperitoneal. Para remoção dos fêmures, foi feita imersão do animal em solução antisséptica de álcool iodado 1% (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil). Após a antisepsia, o animal foi colocado sobre um campo estéril em decúbito lateral. Bilateralmente, foi feita incisão no terço proximal da tíbia em sentido longitudinal ao fêmur até a crista ilíaca, seguida de divulsão da pele afim de expor todo o fêmur e permitir a sua retirada. Após remoção, os fêmures foram transportados em tubos de ensaio (Greiner Bio-One, Alemanha) contendo meio de transporte composto de meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 3 μ g/mL de fungisona e (Gibco-Life Technologies) e 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies). Os fêmures foram transportados para um fluxo laminar onde passaram por antisepsia com imersão em álcool 70% durante 1 minuto, remoção dos tecidos moles remanescentes nas suas porções externas e, em seguida, transferidos para outra placa de petri (Corning Incorporated) contendo clorexidina 2,5% (Bioflora Manipullarium, Brasil) durante mais 1 minuto. Posteriormente, os fêmures foram transferidos para tubos de ensaio (Greiner Bio-One) contendo meio de transporte e deixados sob imersão durante mais 15 minutos. Os tubos de ensaio (Greiner Bio-One) contendo os fêmures imersos em meio de transporte foram vertidos em uma nova placa de petri (Corning Incorporated) para remoção das epífises e irrigação do canal medular com meio de crescimento composto por α -MEM (Gibco-Life Technologies)

com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 0,3 µg/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies) e 50 µg/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies), utilizando seringa de 20 mL acoplada à agulha 21G. A medula óssea obtida foi colhida em tubo de ensaio (Greiner Bio-One) e centrifugada a 600 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em meio de crescimento. As células obtidas da medula óssea foram cultivadas nesse meio até a subconfluência, o que permitiu a seleção das CTMs-MO por adesão ao plástico de tecido de cultura. Após a subconfluência, para se obter o número de células necessário para as injeções locais, as CTMs-MO foram enzimaticamente liberadas e cultivadas por 10 dias em meio de crescimento.

3.1.1.2 Obtenção e cultura de CTMs-TA

As CTMs-TA foram obtidas de acordo com o protocolo descrito por (Freitas et al., 2020). Brevemente, CTMs-TA foram obtidas de tecido adiposo da região inguinal dos mesmos ratos utilizados para obtenção de medula óssea. Após remoção, o tecido adiposo foi transportado em tubos de ensaio (Greiner Bio-One) contendo meio de transporte. No fluxo laminar foi feita lavagem do tecido com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Invitrogen-Life Technologies, EUA) em placa de petri (Corning Incorporated). Após lavagem, o tecido adiposo foi seccionado em fragmentos que foram submetidos à digestão enzimática utilizando colagenase II 0,075% (Gibco-Life Technologies) em placas de petri (Corning Incorporated) mantidas à 37°C e sob agitação por 40 minutos. Para neutralizar a atividade enzimática, foram adicionados 20 mL do meio de crescimento e, em seguida, essa solução foi centrifugada a 600 x g por 8 minutos e o sobrenadante contendo o tecido adiposo foi descartado. As células remanescentes foram ressuscitadas em meio de crescimento para seleção e cultivo das CTMs-TA como descrito acima para as CTMs-MO.

Durante todo o tempo de cultivo, as culturas foram mantidas em estufas com temperatura constante de 37°C em atmosfera umidificada composta por 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios de cultura foram trocados 3 vezes por semana.

3.1.2 Caracterização das culturas celulares

3.1.2.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA

Para caracterização dessas culturas como CTMs, foram avaliadas a aderência ao plástico de cultura de tecidos, a expressão de um painel de marcadores de superfície e a diferenciação nas linhagens osteoblástica e adipocítica.

3.1.2.1.1 Aderência ao plástico

A aderência das CTMs-MO e CTMs-TA ao plástico de cultura de células foi avaliada ao longo de todo o tempo de cultivo por meio de microscópio de fase invertido (Axiovert 25 Zeiss, Alemanha) e fotografados aos 3 e 6 dias utilizando uma câmera digital de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, Japão).

3.1.2.1.2 Expressão de marcadores de superfície

A expressão dos marcadores de superfície foi avaliada ao final de 10 dias de cultura. Para tanto, as culturas de ambas as CTMs foram lavadas com PBS (Invitrogen-Life Technologies), tripsinizadas (Gibco-Life Technologies) e a suspensão de células ajustada para a concentração final de 5×10^5 células em cada tubo. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em ausência de luz e separadamente com os anticorpos primários anti-CD29, CD31, CD34, CD44, CD90 e CD106 (eBioscience e B&D Biosystems, EUA). Ao final da incubação, as células foram homogeneizadas em 2 mL de PBS (Invitrogen-Life Technologies) e centrifugadas a $600 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células, lavadas com PBS (Invitrogen-Life Technologies) para remover o excesso de anticorpos. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μ L de solução de formaldeído (Merck, Alemanha) diluído a 1% em PBS (Invitrogen-Life Technologies) e as células, estocadas em refrigerador ao abrigo da luz para posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCanto™ (B&D Biosystems).

3.1.2.2 Diferenciações osteoblástica e adipocítica das CTMs-MO e CTMs-TA

Para a diferenciação osteoblástica, as CTMs-MO e CTMs-TA foram cultivadas em meio osteogênico, que é o meio de crescimento ao qual são adicionados 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerolfosfato 7 mM (Sigma-Aldrich) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). Para a diferenciação adipocítica, as células foram cultivadas em meio adipogênico, que é o meio de crescimento ao qual são adicionados dexametasona 10^{-6} M (Sigma-Aldrich), 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 µM (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e indometacina 0,1 M (Sigma-Aldrich). A diferenciação osteoblástica foi avaliada pela formação de matriz extracelular mineralizada e a adipocítica pela formação de acúmulo lipídico.

3.1.2.2.1 Formação e quantificação de matriz extracelular mineralizada

Após 21 dias em meio osteogênico, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas por 24 horas com formalina 10%, desidratadas em bateria crescente de álcoois (30% a 100%) e coradas com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) 2%, que cora as áreas ricas em cálcio. Após a coloração, primeiramente, as culturas foram fotografadas para, em seguida, se obter a quantificação do vermelho de alizarina incorporado às culturas conforme descrito por Gregory et al. (2004). Brevemente, para extração do vermelho de alizarina, 150 µL de ácido acético 10% foram adicionados a cada cultura e mantidos à temperatura ambiente sob agitação constante por 30 minutos. A seguir, a solução de cada poço foi homogeneizada, transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Inicialmente, os tubos foram incubados a 85°C por 10 minutos e posteriormente transferidos para um Becker contendo gelo, onde foram mantidos por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13000 x g por 15 minutos e 150 µL do sobrenadante foram transferidos para placa de poliestireno de 96 poços (Corning Incorporated). Para neutralizar o ácido, foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônia 10% em cada poço e a absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc, EUA), no comprimento de onda de 405 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos como absorbância.

3.1.2.2 Formação e quantificação de acúmulo lipídico

Após 17 dias de cultivo em meio adipogênico, as culturas foram fixadas com formalina tamponada 10% por 1 hora, lavadas com isopropanol 60% (Merck) e coradas com óleo vermelho 2% (Sigma-Aldrich) por 15 minutos à temperatura ambiente, que cora em vermelho áreas de depósito de lipídeos. As culturas foram fotografadas e em seguida, foi realizada a extração do óleo vermelho (Sigma-Aldrich). Em cada poço foram acrescentados 750 µL de isopropanol 100% (Merck) e as placas foram mantidas sob agitação por 10 minutos. A solução obtida foi transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos e utilizadas para a leitura em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc.) em um comprimento de onda de 500 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos como absorbância.

3.2 EXPERIMENTOS IN VIVO

3.2.1 Procedimento cirúrgico para criação do defeito ósseo

Ratos machos Sprague-Dawley com 5 semanas de idade pesando em torno de 150 g foram utilizados para a criação de defeitos ósseos com diâmetro de 5 mm nas calvárias. Os animais foram anestesiados pela combinação de Xilazina 6 mg/kg de peso corporal (Agibrands do Brasil Ltda, Brasil) e Ketamina 75 mg/kg de peso corporal (Agibrands) administradas pela via intraperitoneal. Após tricotomia e antissepsia com solução de álcool iodado 1% (Dinâmica Química Contemporânea), os ratos foram cobertos com campos cirúrgicos estéreis com exposição apenas da região dorsal da cabeça, cuja pele e tecido subcutâneo foram incisados seguindo a sutura sagital com o objetivo de expor os ossos parietais. O perióstio desses ossos foi destacado para criar um defeito unilateral por meio de broca trefina (Neodent, Brasil) com 5 mm de diâmetro. Para evitar lesão ao tecido ósseo remanescente, o procedimento foi realizado sob irrigação abundante com soro fisiológico. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral foi proposto por Gomes e Fernandes (2011) com os objetivos de minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral. Em seguida, a pele foi suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e a fim de possibilitar a localização do defeito para, posteriormente, realizar-se as injeções de células, seus limites foram determinados

por palpação e delimitados na pele com marcadores permanentes (Sharpie, Sharpieville, EUA). Para controle da dor, os ratos receberam pré-operatóriamente e imediatamente ao final da cirurgia Flunixinina meglumina (2,5 mg/kg) (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Também receberam antibioticoterapia com dose única de solução de antibióticos contendo Benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), Benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), Diidroestreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) e Estreptomicina base (sulfato) (65 mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Durante todo o período pós-operatório até o momento da eutanásia, os ratos foram mantidos no biotério da FORP/USP (3 ratos/caixa), observados diariamente e com ração e água “ad libitum”.

3.2.2 Tratamento dos defeitos ósseos

Após a criação dos defeitos, os ratos foram aleatoriamente alocados em um dos 3 grupos de tratamento, como mostrado na Tabela 1. Em todos os grupos os ratos receberam 2 injeções locais realizadas 2 e 6 semanas após a criação dos defeitos, sendo que o grupo controle foi tratado com 2 injeções de PBS (50 µL), o grupo CTMs-MO/CTMs-TA que receberam a primeira injeção de CTMs-MO e a segunda injeção de CTMs-TA e o grupo CTMs-TA/CTMs-MO cuja primeira injeção foi de CTMs-TA e a segunda de CTMs-MO. Todas as injeções de células foram feitas injetando 5×10^6 células em 50 µL de PBS.

Tabela 1. Tratamentos dos defeitos de calvária de ratos com injeções 2 e 6 semanas após a criação dos defeitos de PBS, CTMs-MO ou CTMs-TA.

GRUPO	INJEÇÃO	
	2 semanas	6 semanas
Controle	PBS	PBS
CTMs-MO/CTMs-TA	CTMs-MO	CTMs-TA
CTMs-TA/CTMs-MO	CTMs-TA	CTMs-MO

Os animais foram anestesiados como descrito no item 3.2.1, e as injeções foram realizadas com a utilização de uma agulha 21G inserida subperiostealmente tangenciando a calota craniana, de tal forma que a extremidade da agulha estivesse próxima ao centro do defeito e com o bixel voltado para posição ventral. A quantidade de células e o volume de PBS são baseados em resultados do nosso grupo de pesquisa e em cálculos que levaram em consideração o volume do defeito ósseo e a média do volume celular (Docheva et al., 2008; Souza et al., 2018).

Decorridas 8 semanas da primeira injeção de células (10 semanas da criação dos defeitos), os animais foram eutanaziados com dose excessiva de Tiopental Sódico 1% (Thiopentax, Cristália) via intraperitoneal. Confirmada a morte do animal, foi feita decapitação e as cabeças foram mantidas em solução de formol tamponado à 10%, pH 7, por no mínimo 48 horas. Após este período, as calvárias foram removidas com utilização de um disco diamantado (KG Sorensen, Brasil) e reduzidas para as avaliações microtomográfica e histológica.

3.2.3 Análise microtomográfica e morfométrica (μ CT)

As análises microtomográficas e morfométricas foram realizadas no μ CT SkyScan 1172 (Bruker, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1 μ m. As projeções microtomográficas bidimensionais (2D) e reconstruções tridimensionais (3D) foram obtidas por meio do software NRecon (versão 1.15.4.0, Bruker). As reconstruções 3D foram analisadas pelo software CT Analyser (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker) para obtenção dos parâmetros: 1) volume de tecido ósseo (mm^3), 2) porcentagem do volume de tecido ósseo em relação ao volume total do defeito (%), 3) superfície óssea (mm^2), 4) espessura trabecular (mm), 5) número de trabéculas (mm^{-1}), 6) separação trabecular (mm). Estes parâmetros morfométricos são automaticamente gerados pelo software Ctan e são preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (Bouxsein et al., 2010; Dempster et al., 2013).

3.2.4 Análise Histológica

Posteriormente às análises microtomográficas e morfométricas, os fragmentos de calvária foram descalcificados em EDTA a 4%, lavados em água corrente e desidratados por meio de sequência de álcoois com concentração crescente (50 a 100%). Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol até ficarem transparentes e impregnadas em parafina por meio de 3 banhos de 3 horas em estufa a 60°C. Após a inclusão das amostras em formas com parafina e o corte em micrótomo com 5 µm de espessura foi feita a coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha) para descrição histológica dos tecidos presentes, que estava acoplado a uma câmera digital (AxioCam ICc3, Carl Zeiss) que possibilitou a documentação fotográfica.

3.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa R 4.0 (RStudio Software, Nova Zelândia). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Para os experimentos que envolveram comparação entre dois grupos, formação de matriz extracelular mineralizada (n=5) e formação de acúmulo lipídico (n=5) foi utilizado o teste t. Os parâmetros microtomográficos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das culturas celulares

4.1.1 Caracterização das CTMs-MO e CTMs-TA

4.1.1.1 Aderência ao plástico

As CTMs-MO (Figura 1A e B) e CTMs-TA (Figura 1C e D), como esperado, aderiram ao plástico de cultura de células e proliferaram sem alterações visíveis em seus padrões de crescimento e com aspecto morfológico alongado típico de células fibroblásticas, conforme mostrado na Figura 1.

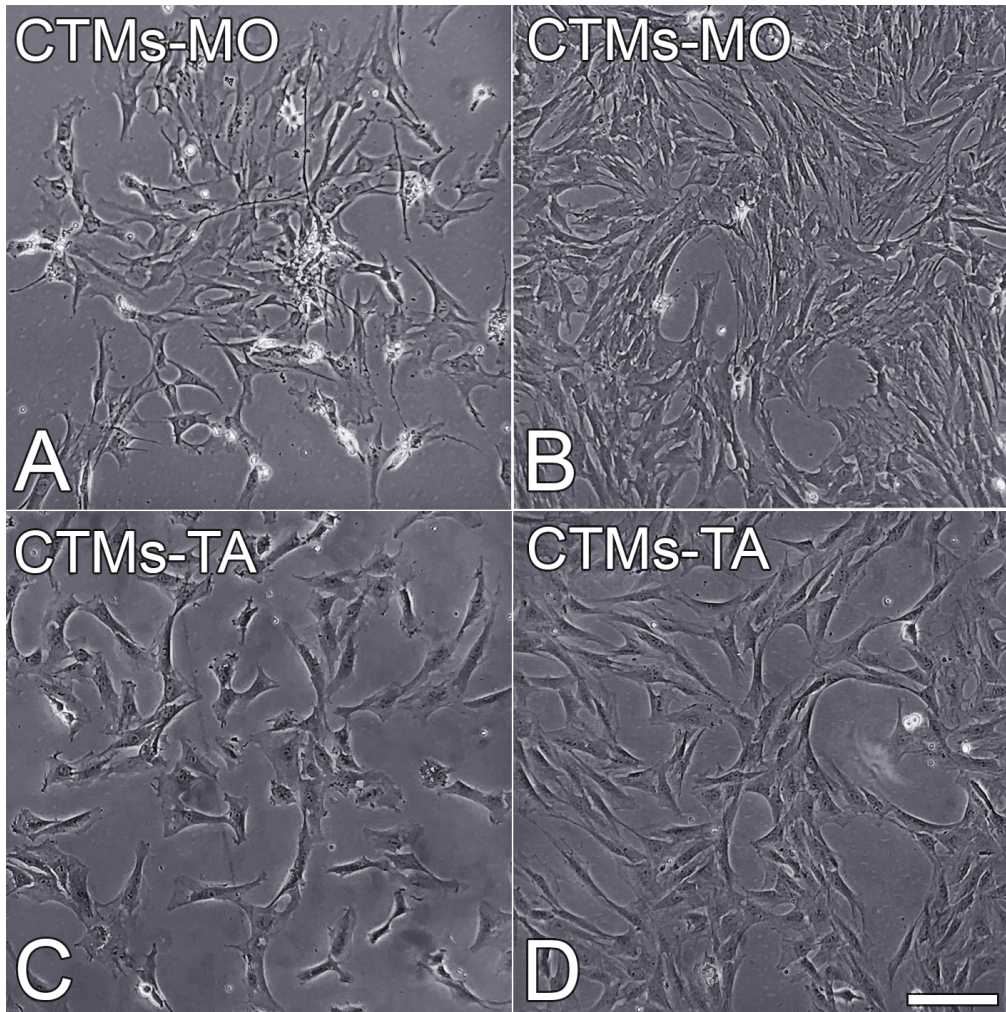


Figura 1. CTMs aderidas ao plástico de cultura. CTMs-MO aos 3 (A) e 6 dias (B) e CTMs-TA aos 3 (C) e 6 dias (D). Barra de escala: A e C= 100 μ m; B e D= 120 μ m.

4.1.1.2 Expressão dos marcadores de superfície

Aos 10 dias de cultura, o perfil de expressão dos marcadores de superfície mostrou que as CTMs-MO e CTMs-TA exibem alta porcentagem de células expressando os marcadores de superfície CD29 e CD90, em torno de 30% expressando CD106 e baixa porcentagem de células expressando CD31, CD34 e CD44, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de CTMs-MO e de CTMs-TA expressando marcadores de superfície

Marcadores de Superfície	CTMs-MO (%)	CTMs-TA (%)
CD29	99,8	99,9
CD90	79,2	98,4
CD31	8,5	6,4
CD34	0,3	1,0
CD44	1,0	0,8
CD106	31,2	27,5

4.1.2 Diferenciações osteoblástica e adipocítica das CTMs-MO e CTMs-TA

4.1.2.1 Formação e quantificação de matriz extracelular mineralizada

Aos 21 dias de cultura, a diferenciação osteoblástica, avaliada pela formação de matriz extracelular mineralizada, foi observada nas CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em condições osteogênicas. Os resultados, apresentados na Figura 2, mostram que as CTMs-MO produziram maior (test t; $p=0,003$) mineralização da matriz extracelular que CTMs-TA.

Matriz Extracelular Mineralizada

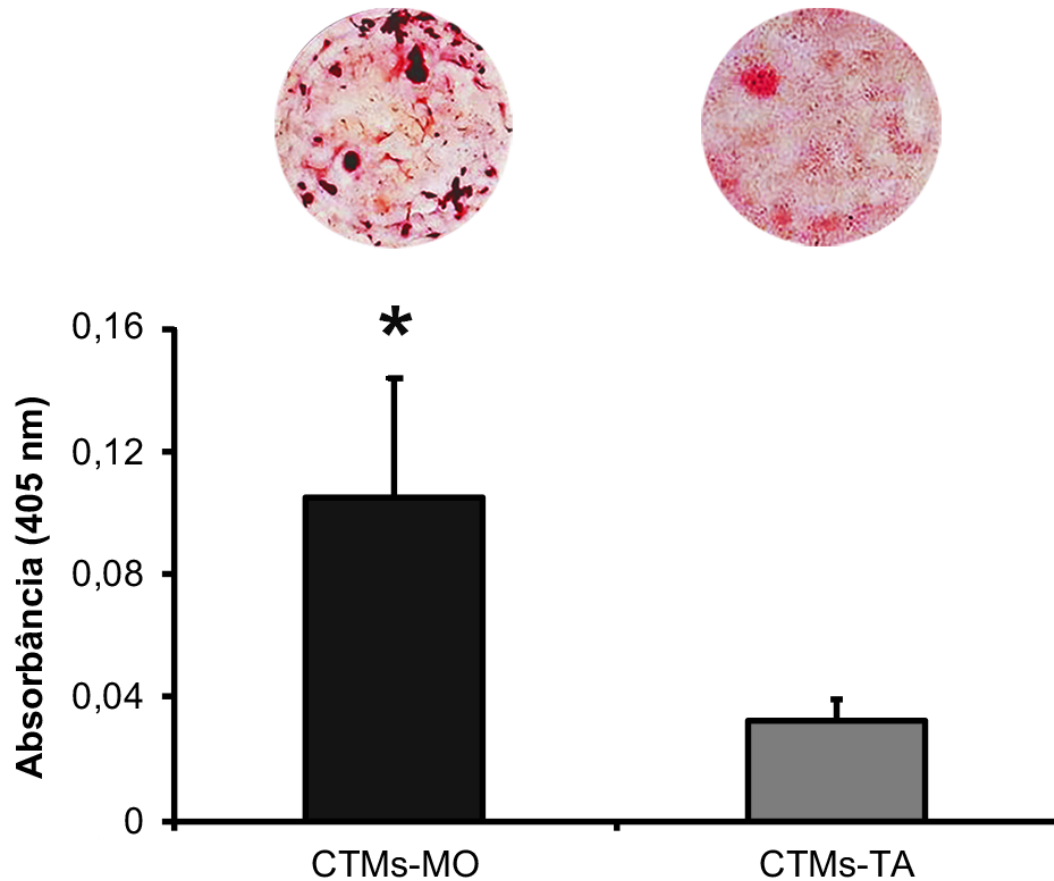


Figura 2. Matriz extracelular mineralizada produzida por CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio osteogênico por 21 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,003$).

4.1.2.2 Formação e quantificação de acúmulo lipídico

Aos 17 dias de cultura, a diferenciação adipocítica, avaliada pelo acúmulo lipídico, foi observada nas CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em condições adipogênicas. Os resultados, apresentados na Figura 3, mostram que as CTMs-MO produziram menor (test t; $p=0,001$) acúmulo lipídico que as CTMs-TA.

Acúmulo de Lipídios

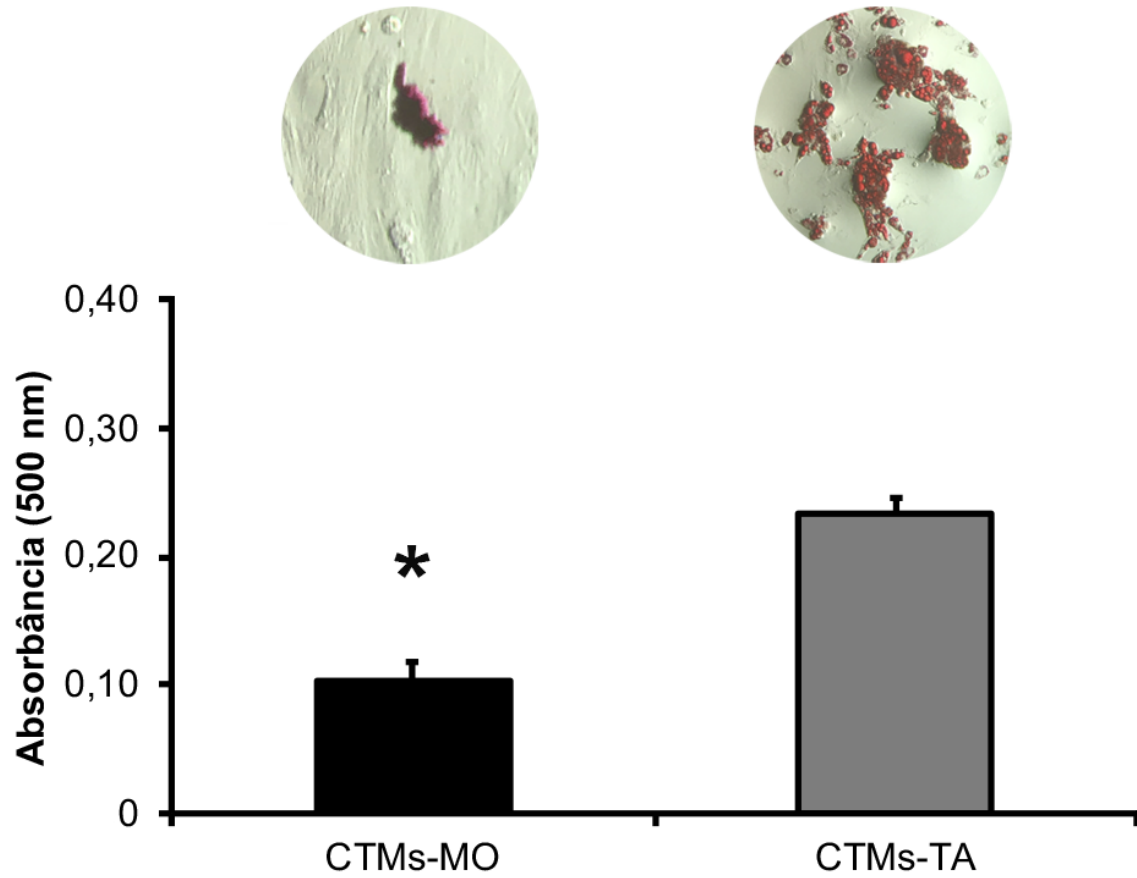


Figura 3. Acúmulo lipídico produzido por CTMs-MO e CTMs-TA cultivadas em meio adipogênico por 17 dias. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=5). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,001).

4.2 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO ou CTMs-TA por μ CT

As imagens das reconstruções 3D obtidas por μ CT revelam que 8 semanas após a primeira injeção local, aqueles defeitos que receberam CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO mostram maior formação óssea quando comparados aos defeitos Controle, que foram tratados com PBS (Figura 4A-C). Os parâmetros gerados pela análise de μ CT indicaram que o volume de tecido ósseo (mm^3) (Figura 4D, teste de One-Way Anova seguido pelo teste de Tukey; $p=0,03$), porcentagem do volume de tecido ósseo em relação ao volume total do defeito (%) (Figura 4E, teste de One-Way Anova seguido pelo teste de Tukey; $p=0,03$) e o número de trabéculas (mm^{-1}) (Figura 4H, teste de One-Way Anova seguido pelo teste de Tukey; $p=0,05$) foram maiores em defeitos de calvária tratados com CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO comparados com veículo PBS (Controle). A superfície óssea (mm^2) (Figura 4F, teste de One-Way Anova $p=0,278$), espessura trabecular (mm) (Figura 4G, teste de One-Way Anova $p=0,459$) e a separação trabecular (mm) (Figura 4I, teste de One-Way Anova $p=0,829$) não foram afetadas por qualquer tratamento. Todas as reconstruções 3D são apresentadas nos Anexos A, B e C.

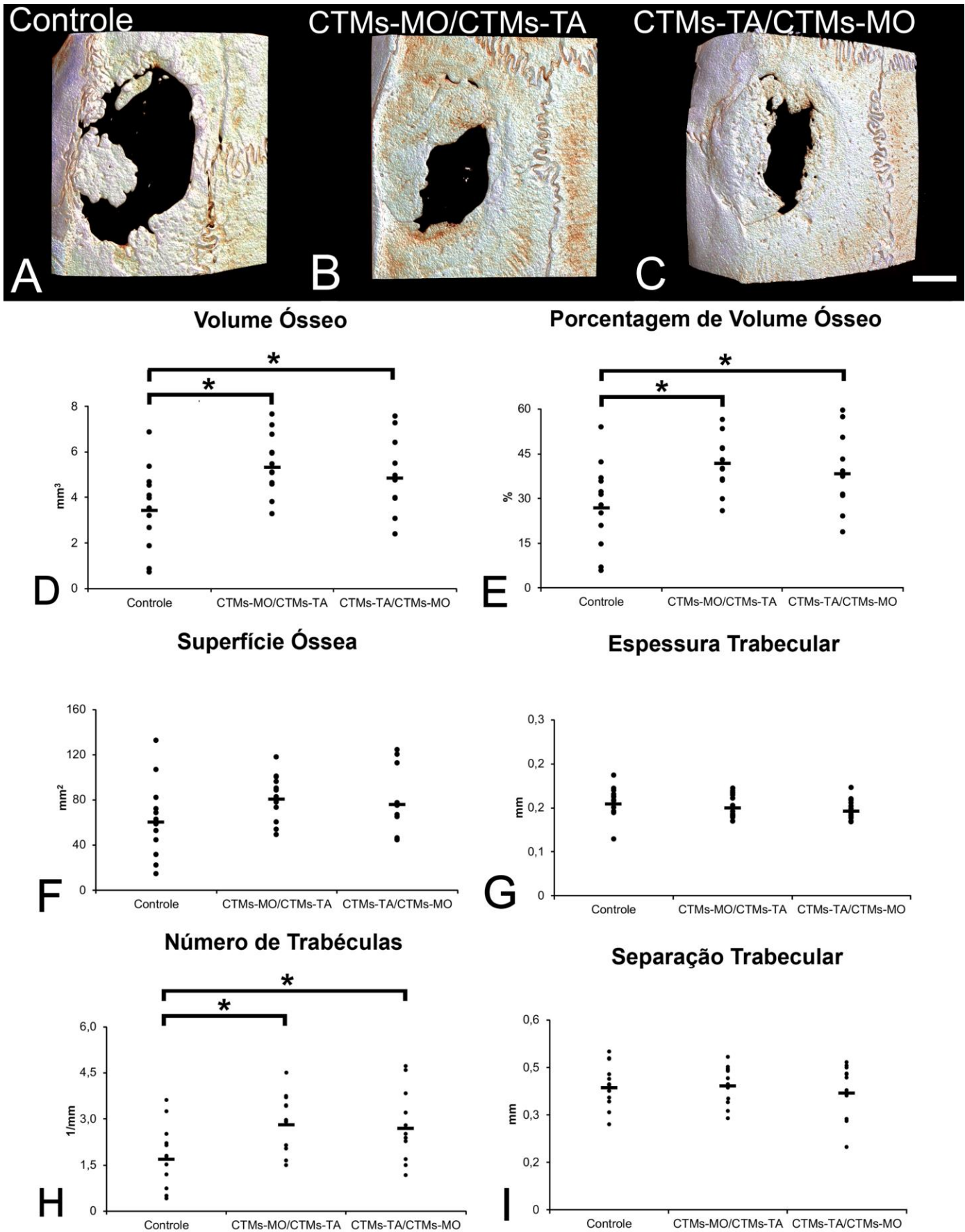


Figura 4. Reconstruções 3D geradas por μ CT e parâmetros morfométricos da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com de injeção local de solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem células (Controle - A), CTMs-MO/CTMs-TA (B) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C) em 8 semanas (n=12). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Barra de escala: A–C= 1 mm.

4.3 Avaliação da formação de tecido ósseo após injeções de CTMs-MO ou CTMs-TA por análise histológica

Em geral, os cortes histológicos mostraram significativa formação óssea em defeitos tratados com injeção local de CTMs-MO/CTMs-TA (Figura 5B e E) ou CTMs-TA/CTMs-MO (Figura 5C e F), enquanto os defeitos que receberam apenas o veículo PBS (Controle) estavam preenchidos por tecido conjuntivo com reduzida formação óssea nas margens dos defeitos (Figura 5A-D). Corroborando as análises microtomográficas, os defeitos de tratados com injeções locais de CTMs-MO/CTMs-TA (Figura 5B e E) ou de CTMs-TA/CTMs-MO (Figura 5C e F) exibiram aproximadamente a mesma quantidade de tecido ósseo, que na porção mais ventral dos defeitos tem características morfológicas de osso lamelar com presença de canais de Havers e na parte dorsal com aspecto de osso imaturo ainda não organizado em lamelas, mas ambos apresentando muitas lacunas com osteócitos e vários vasos sanguíneos (Figura 5E e F).

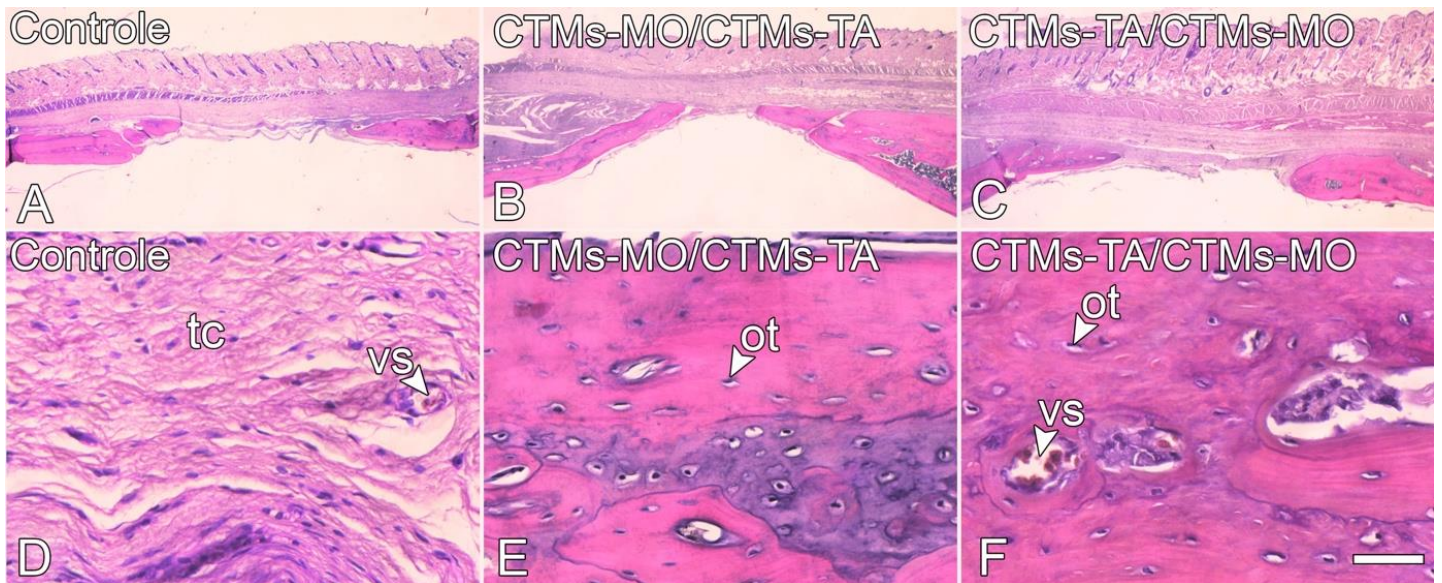


Figura 5. Fotomicrografia por microscopia de luz dos defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem células (Controle - A e D), CTMs-MO/CTMs-TA (B e E) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C e F) em 8 semanas. Enquanto nos defeitos injetados com CTMs-MO/CTMs-TA (B e E) ou CTMs-TA/CTMs-MO (C e F) observou-se formação de tecido ósseo, os defeitos Controle (A e D) foram preenchidos por tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE). tc: tecido conjuntivo; vs: vaso sanguíneo; ot: osteócito. Barra de escala: A–C= 1,25 mm; D–F= 100 μ m.

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar o efeito da terapia celular realizado por meio de injeções locais de CTMs-MO e CTMs-TA na formação de tecido ósseo em defeitos criados em calvária de ratos. Inicialmente, CTMs-MO obtidas de fêmures e CTMs-TA, da gordura inguinal de ratos foram selecionadas por adesão ao plástico de cultura e caracterizadas como CTMs pela expressão de marcadores de superfície e pela diferenciação nas linhagens osteoblástica e adipocítica. Posteriormente, as CTMs-MO e CTMs-TA foram injetadas localmente em defeitos criados em calvária de ratos e a formação óssea avaliada pelas análises microtomográficas e histológicas.

A obtenção das culturas de CTMs da medula óssea (CTMs-MO) e do tecido adiposo (CTMs-TA) foi feita de acordo com o protocolo descrito por Freitas et al (2020). Os procedimentos aqui utilizados são de baixo custo, de fácil e rápida execução obtendo uma população de células ricas em CTMs a partir dos fêmures (CTMs-MO) e da gordura inguinal (CTMs-TA).

Em relação a caracterização de CTMs, em 2006 Dominici e colaboradores por demanda do comitê de Células-Tronco e do Tecido Mesenquimal e da Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceram critérios para caracterizar culturas de CTMs, tais como: que estas células devem aderir ao plástico em condições padrão de cultura celular; devem expressar alguns marcadores de superfície, como por exemplo CD73, CD90 e CD105, mas não devem expressar outros marcadores, como por exemplo CD14, CD34 e CD45; e serem multipotentes, isto é, ter capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. Como demonstrado, as CTMs utilizadas neste estudo preencheram esses critérios porque as células aderiram ao plástico com morfologia fibroblastóide, exibiram alta porcentagem de células expressando os marcadores de superfície positivos para CTMs, CD29 e CD90, em torno de 30% expressando CD106 além de uma baixa porcentagem de células expressando os marcadores de superfície das células hematopoiéticas ou endoteliais, como CD31, CD34 e CD44. As diferenciações osteoblástica e adipocítica das CTMs-MO e CTMs-TA foram avaliadas através da formação de matriz extracelular mineralizada e do acúmulo de lipídios, respectivamente. Os resultados mostraram que ambas as CTMs são capazes de diferenciação osteoblástica e adipocítica, o que está de acordo com estudos

anteriores do nosso grupo de pesquisa e de outros pesquisadores (Abuna et al., 2016; Kern et al., 2006; Peng et al., 2008; Rebelatto et al., 2008). Entretanto, as culturas de CTMs-MO exibem maior potencial osteogênico quando comparadas às CTMs-TA, enquanto estas apresentam maior potencial adipogênico quando comparadas às CTMs-MO. Alguns autores têm proposto que as células preservam algumas características do tecido de origem e essa seria uma possível explicação para essa tendência de potencial mais osteogênico das CTMs-MO e mais adipogênico das CTMs-TA (Abuna et al., 2016; Pachon-Pena et al., 2011; Post et al., 2008; Sakaguchi et al., 2005). Interessante que, a análise do perfil genômico de CTMs-MO e CTMs-TA, cultivadas sob as mesmas condições experimentais, sugere que as CTMs-TA teriam maior potencial angiogênico enquanto as CTMs-MO teriam maior potencial osteogênico (Fideles et al., 2019), o que motivou a realização deste estudo visando avaliar a eficácia da combinação dessas células na terapia celular para induzir a formação de tecido ósseo, uma vez que as células endoteliais vasculares estimulam a maturação e a atividade dos osteoblastos, a angiogênese está intimamente associada ao sucesso da regeneração óssea (Saran et al., 2014).

A avaliação da eficácia da terapia celular foi feita de acordo com protocolo anteriormente estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa (Freitas et al., 2017; Freitas et al., 2019a; Freitas et al., 2019b; Souza et al., 2018; Souza et al., 2020). Neste protocolo, defeitos de 5 mm criados em calvária de ratos somente são tratados 2 semanas após sua criação para mimetizar defeitos ósseos pré-existentes. As células são injetadas localmente utilizando agulha 21G que não compromete sua viabilidade (Freitas et al., 2019a; Souza et al., 2018) e elas permanecem no local da injeção por pelo menos 12 dias (Freitas et al., 2019a; Freitas et al., 2019b). Para defeitos de 5 mm em calvária de ratos, maior formação de tecido ósseo ocorre quando são injetadas 5×10^6 células (Freitas et al., 2019a). No entanto, diferentemente do protocolo acima descrito, neste estudo utilizou-se duas injeções de CTMs, uma após 2 semanas e a segunda após 6 semanas da criação do defeito com a combinação de 1ª. injeção/2ª. injeção sendo CTMs-MO/CTMs-TA e CTMs-TA/CTMs-MO, com duas injeções de PBS como controle. Este tratamento foi definido a partir dos resultados de Freitas (2019) que mostraram que o uso de injeções semanais de células resultam em redução da formação óssea.

Como esperado, o uso de CTMs resultou em maior formação óssea após 8 semanas da criação dos defeitos. Dos 6 parâmetros morfométricos analisados por microtomografia, foi observado maior aumento da formação óssea em 3 deles, volume ósseo, porcentagem de volume ósseo e espessura trabecular. Corroborando com esses achados, a análise histológica mostrou uma significativa formação óssea em defeitos tratados com injeções locais de CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO, enquanto para o grupo que recebeu o veículo PBS (Controle) os defeitos estavam predominantemente preenchidos por tecido conjuntivo com reduzida formação óssea limitada às margens do defeito.

A ausência de diferenças na formação óssea com o uso de CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO mostram que ambas as CTMs contribuem para a formação de tecido ósseo, mesmo que por eventuais diferentes mecanismos. Nossos resultados prévios mostram que as CTMs-TA apresentam perfil genômico angiogênico e as CTMs-MO perfil mais osteogênico (Fideles et al., 2019), mas em condições controladas de cultura. As CTMs podem apresentar diferenças em suas características genômicas, transcriptômicas e secretômicas na dependência do ambiente (Watt et al., 2013). Quando utilizadas isoladamente, mas também por meio de injeção local ambas são capazes de induzir formação óssea em defeitos de calvária de ratos (Freitas et al., 2019a).

Neste estudo não foram realizados experimentos que pudessem explicar os mecanismos pelos quais as CTMs são eficazes para induzir a formação de tecido ósseo. No entanto, evidências indicam que o efeito terapêutico induzido por CTMs é, ao menos em parte, devido a habilidade dessas células de modificarem o microambiente do hospedeiro (efeito parácrino) desempenhando papel importante pela liberação de citocinas, fatores de crescimento e sinalização exossômica, na consolidação de fraturas (Granero-Molto et al., 2009; Linero et al., 2014; Yakubovich et al., 2017). Atrelado a isso está uma limitada resposta inflamatória, que facilita a osteogênese e a angiogênese, contribuindo para o reparo ósseo (Shao et al., 2015).

Analisando todos esses achados, nesse estudo nós mostramos que a terapia celular baseada em injeções locais de CTMs-MO/CTMs-TA ou CTMs-TA/CTMs-MO é efetiva em induzir significativa formação óssea. No entanto, a completa regeneração dos defeitos com injeção local de células não foi alcançada, como evidenciado em

reconstruções 3D e análise histológica, o que continua a ser um desafio que merece investigações adicionais.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O método empregado para obtenção e isolamento das CTMs-MO e CTMs-TA resultou em uma população rica em CTMs.
- Injeções locais de CTMs-MO ou CTMs-TA, comprovando a eficácia da terapia celular, resultaram em maior formação óssea comparados aos defeitos controles.

REFERÊNCIAS

ABAZARI, M. F., NEJATI, F., NASIRI, N., KHAZENI, Z. A. S., NAZARI, B., ENDERAMI, S. E., MOHAJERANI, H. Platelet-rich plasma incorporated electrospun PVA-chitosan-HA nanofibers accelerates osteogenic differentiation and bone reconstruction. **Gene**, v. 720, p. 144096, 2019.

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

AMABLE, P. R., TEIXEIRA, M. V. T., CARIAS, R. B. V., GRANJEIRO, J. M., BOROJEVIC, R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2014.

ASAMI, T., ISHII, M., FUJII, H., NAMKOONG, H., TASAKA, S., MATSUSHITA, K., ISHII, K., YAGI, K., FUJIWARA, H., FUNATSU, Y., HASEGAWA, N., BETSUYAKU, T. Modulation of murine macrophage TLR7/8-mediated cytokine expression by mesenchymal stem cell-conditioned médium. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

AYKAN, A., OZTURK, S., SAHIN, I., GURSES, S., URAL, A. U., OREN, N. C., ISIK, S. Biomechanical analysis of the effect of mesenchymal stem cells on mandibular distraction osteogenesis. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 2, p. e169-e175, 2013.

BELOTI, M. M., SICCHIERI, L. G., DE OLIVEIRA, P. T., ROSA, A. L. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly (lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 9-10, p. 999-1005, 2012.

BIANCO, P., ROBEY, P. G., SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BIGHAM-SADEGH, A., ORYAN, A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 238-247, 2015.

BOLTZE, J., ARNOLD, A., WALCZAK, P., JOLKKONEN, J., CUI, L., WAGNER, D. C. The dark side of the force—constraints and complications of cell therapies for stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 6, p. 155, 2015.

BOUXSEIN, M. L., BOYD, S. K., CHRISTIANSEN, B. A., GULDBERG, R. E., JEPSEN, K. J., MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.

BROWN, C., MCKEE, C., BAKSHI, S., WALKER, K., HAKMAN, E., HALASSY, S., SVINARICH, D., DODDS, R., GOVIND, C. K., CHAUDHRY, G. R. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1738-1755, 2019.

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

BRYDONE, A. S., MEEK, D., MACLAINE, S., TANNER, K. E., DALBY, M. J. 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, 2010.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CHO, K. A., PARK, M., KIM, Y. H., WOO, S. Y., RYU, K. H. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

DEMPSTER, D. W., COMPSTON, J. E., DREZNER, M. K., GLORIEUX, F. H., KANIS, J. A., MALLUCHE, H., MEUNIER, P. J., OTTO, S. M., RECKER, R. R., PARFITT, A.

M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 2-17, 2013.

DOCHEVA, D., PADULA, D., POPOV, C., MUTSCHLER, W., CLAUSEN-SCHAUMANN, H., SCHIEKER, M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 537-552, 2008.

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

FEIGENSON, M., JONASON, J. H., SHEN, J., LOISELLE, A. E., AWAD, H. A., O'KEEFE, R. J. Inhibition of the Prostaglandin EP-1 Receptor in Periosteum Progenitor Cells Enhances Osteoblast Differentiation and Fracture Repair. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 48, n. 3, p. 927-939, 2020.

FERNANDES, G., YANG, S. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. **Bone Research**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2016.

FIDELES, S. O. M., ORTIZ, A. C., ASSIS, A. F., DUARTE, M. J., OLIVEIRA, F. S., PASSOS G. A., BELOTI, M. M., ROSA, A. L. Effect of cell source and osteoblast differentiation on gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 7, p. 11842-11852, 2019.

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

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

FREITAS, G. P., LOPES, H. B., P SOUZA, A. T., FP OLIVEIRA, P. G., G ALMEIDA, A. L., COELHO, P. G., FERREIRA, F. U., COVAS, D. T., BELOTI, M. M., ROSA, A. L. Effect of cell therapy with osteoblasts differentiated from bone marrow or adipose tissue stromal cells on bone repair. **Regenerative Medicine**, v. 14, n. 12, p. 1107-1119, 2019b.

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

FREITAS, GP. **Efeito de injeções locais de células-tronco mesenquimais ou osteoblastos na regeneração do tecido ósseo**. 2019. 131f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K., LALYKINA, K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetics**. v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHYAN, R. K., LATSINIK, N. V., PANASYUK, A. F., KEILISS-BOROK, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, J. F., KULAGINA, N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, n. 5, p. 267, 1976.

FRIEDENSTEIN, A. J., PIATETZKY-SHAPIRO, I. I., PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

GAO, F., CHIU, S. M., MOTAN, D. A. L., ZHANG, Z., CHEN, L., JI, H. L., TSE, H-F., FU, Q-L., LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 1, p. e2062-e2062, 2016.

GAUBYS, A., PAPECKYS, V., PRANSKUNAS, M. Use of autologous stem cells for the regeneration of periodontal defects in animal studies: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**, v. 9, n. 2, p. 1-17, 2018.

GOMES, P. S., FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.

GRANERO-MOLTÓ, F., WEIS, J. A., MIGA, M. I., LANDIS, B., MYERS, T. J., O'REAR, L., LONGOBARDI, L., JANSEN, E. D., MORTLOCK, D. P., SPAGNOLI, A. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p. 1887-1898, 2009.

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

GREGORY, C. A., GUNN, W. G., PEISTER, A., PROCKOP, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.

HAN, Y., LI X., ZHANG, Y., HAN, Y., CHANG, F., DING, J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 886, 2019.

HARRELL, C. R., JOVICIC, N., DJONOV, V., VOLAREVIC, V. Therapeutic Use of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: From Basic Science to Clinics. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 474, 2020.

HORWITZ, E. M., ANDREEF, M., FRASSONI, F. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 6, p. 419-425, 2006.

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

HUANG, S., XU, L., SUN, Y., ZHANG, Y., LI, G. The fate of systemically administered allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 30-32, 2015.

IAQUINTA, M. R., MAZZONI, E., BONONI, I., ROTONDO, J. C., MAZZIOTTA, C., MONTESI, M., SPRIO, S., TAMPIERI, A., TOGNON, M., MARTINI, F. Adult stem cells for bone regeneration and repair. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 1-15, 2019.

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

KACHGAL, S., PUTNAM, A. J. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. **Angiogenesis**, v. 14, n. 1, p. 47-59, 2011.

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

KFOURY, Y., SCADDEN, D. T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 239-253, 2015.

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

KIM, K., PARK, S., IM, G. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 35, n. 17, p. 4792-4804, 2014.

KIM, Y. J., KIM, H. K., CHO, H. H., BAE, Y. C., SUH, K. T., JUNG, J. S. Direct Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular Ischemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 867-876, 2007.

KOVACH, T. K., DIGHE, A. S., LOBO, P. I., CUI, Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 17, 2015.

LIAO, H. T., CHEN, C. T., CHEN, C. H., CHEN, J. P., TSAI, J. C. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, v. 70, n. 1, p. 228-237, 2011.

LIAO, Y., ZHANG, X. L., LI, L., SHEN, F. M., ZHONG, M. K. Stem cell therapy for bone repair: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies with large animal models. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 718-726, 2014b.

LINERO, I., CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. 1-12, 2014.

LIU, Y., WANG, H., DOU, H., TIAN, B., LI, L., JIN, L., ZHANG, Z., HU, L. Bone regeneration capacities of alveolar bone mesenchymal stem cells sheet in rabbit calvarial bone defect. **Journal of Tissue Engineering**, v. 11, n. 4, 2020.

LONGONI, A., KNEŽEVIĆ, L., SCHEPERS, K., WEINANS, H., ROSENBERG, A. J. W. P., GAWLITTA, D. The impact of immune response on endochondral bone regeneration. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2018.

LU, J., WANG, Q. Y., SHENG, J. G. Exosomes in the repair of bone defects: next-generation therapeutic tools for the treatment of nonunion. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 11, 2019.

MANIERI, N. A., MACK, M. R., HIMMELRICH, M. D., WORTHLEY, D. L., HANSON, E. M., ECKMANN, L., WANG, T. C., STAPPENBECK, T. S. Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis. **The Journal Clinical Investigation**, v. 125, n. 9, p. 3606-3618, 2015.

MEGUID, E. A., KE, Y., JI, J., EL-HASHASH, A. H. K. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 1825-1835, 2017.

MOON, M. H., KIM, S. Y., KIM, Y. J., KIM, S. J., LEE, J. B., BAE, Y. C., SUNG, S. M., JUNG, J. S. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 279-290, 2006.

MURPHY, M. B., MONCIVAIS, K., CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 45, n. 11, p. 1-16, 2013.

NANCARROW-LEI, R., MAFI, P., MAFI, R., KHAN, W. A systemic review of adult mesenchymal stem cell sources and their multilineage differentiation potential relevant to musculoskeletal tissue repair and regeneration. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 8, p. 601-610, 2017.

ORCIANI, M., FINI, M., DI PRIMIO, R., MATTIOLI-BELMONTE, M. Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1-15, 2017.

ORYAN, A., ALIDADI, S., MOSHIRI, A., MAFFULLI, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 1-27, 2014.

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

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

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

PITTINGER, M. F., DISCHER, D. E., PÉAULT, B. M., PHINNEY, D. G., HARE, J. M., CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **NPJ Regenerative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2019.

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

REBELATTO, C. K., AGUIAR, A. M., MORETÃO, M. P., SENEGAGLIA, A. C., HANSEN, P., BARCHIKI, F., OLIVEIRA, J., MARTINS, J., KULIGOVSKI, C., MANSUR, F., CHRISTOFIS, A., AMARAL, V. F., BROFMAN, P. S., GOLDENBERG, S., NAKAO, L. S., CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.

REHMAN, J., TRAKTUEV, D., LI, J., MERFELD-CLAUSS, S., TEMM-GROVE, C. J., BOVENKERK, J. E., PELL, C. L., JOHNSTONE, B. H., CONSIDINE, R. V., MARCH, K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-1298, 2004.

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

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

SANGHANI-KERAI, A., MCCREARY, D., LANCASHIRE, H., OSAGIE, L., COATHUP, M., BLUNN, G. Stem cell interventions for bone healing: fractures and osteoporosis. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 5, p. 369-377, 2018.

SARAN U, GEMINI PIPERNI S, CHATTERJEE S. Role of angiogenesis in bone repair. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 109–117, 2014.

SEMYARI, H., RAJIPOUR, M., SABETKISH, S., SABETKISH, N., ABBAS, F. M., KAJBAFZADEH, A. M. Evaluating the bone regeneration in calvarial defect using osteoblasts differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells on three different scaffolds: an animal study. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 1, p. 69-83, 2016.

SHAO, J., ZHANG, W., YANG, T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 1-7, 2015.

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

SMADJA, D. M., C D'AUDIGIER, C., GUERIN, C. L., MAUGE, L., DIZIER, B., J-S SILVESTRE, J-S., CORTIVO, L. D., GAUSSEM, P., EMMERICH, J. Angiogenic potential of BM MSCs derived from patients with critical leg ischemia. **Bone Marrow Transplantation**, v. 47, n. 7, p. 997-1000, 2012.

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

SOUZA, A. T. P., LOPES, H. B., FREITAS, G. P., FERRAZ, E. P., OLIVEIRA, F. S., ALMEIDA, A. L. G., WEFFORT, D., BELOTI, M. M., ROSA, A. L. Role of embryonic

origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 38, n. 4, p. 481-490, 2020.

SPEES, J. L., LEE, R. H., GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2016.

TAGUCHI, K., OGAWA, R., MIGITA, M., HANAHA, H., ITO, H., ORIMO, H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 1, p. 31-36, 2005.

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

TAWONSAWATRUK, T., WEST, C. C., MURRAY, I. R., SOO, C., PÉAULT, B., SIMPSON, A. H. R. W. Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing–non-union. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-7, 2016.

TÖGEL, F., WEISS, K., YANG, Y., HU, Z., ZHANG, P., WESTENFELDER, C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 5, p. F1626-F1635, 2007.

TROHATOU, O., ROUBELAKIS, M. G. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine: past, present, and future. **Cellular Reprogramming**, v. 19, n. 4, p. 217-224, 2017.

TSIAPALIS, D., O'DRISCOLL, L. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 991, 2020.

WANG, X., WANG, C., GOU, W., XU, X., WANG, Y., WANG, A., XU, W., GUO, Q., LIU, S., LU, Q., MENG, H., YUAN, M., PENG, J., LU, S. The optimal time to inject bone

mesenchymal stem cells for fracture healing in a murine model. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

WATANABE, M., YAVAGAL, D. R. Intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells. **Brain Circulation**, v. 2, n. 3, p. 114, 2016.

WATT, S. M., GULLO, F., VAN DER GARDE, M., MARKESON, D., CAMICIA, R., KHOO, C. P., ZWAGINGA, J. J. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. **British Medical Bulletin**, v. 108, n. 1, p. 25-53, 2013.

XIE, H., WANG, Z., ZHANG, L., LEI, Q., ZHAO, A., WANG, H., LI, Q., CAO, Y., ZHANG, W. J., CHEN, Z. Extracellular vesicle-functionalized decalcified bone matrix scaffolds with enhanced pro-angiogenic and pro-bone regeneration activities. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

XU, L., LIU, Y., SUN, Y., WANG, B., XIONG, Y., LIN, W., WEI, Q., WANG, H., HE, W., WANG, B., LI, G. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

YAKUBOVICH, D. C., SHEYN, D., BEZ, M., SCHARY, Y., YALON, E., SIRHAN, A., AMIRA, M., YAYA, A., DE MEL, S., DA, X., BEN-DAVID, S., TAWACKOLI, W., LEY, E. J., GAZIT, D., GAZIT, Z., PELLEDE, G. Systemic administration of mesenchymal stem cells combined with parathyroid hormone therapy synergistically regenerates multiple rib fractures. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.

YAMADA, Y., UEDA, M., NAIKI, T., TAKAHASHI, M., HATA, K. I., NAGASAKA, T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 5, p. 955-964, 2004.

YAN, Z., HANG, D., GUO, C., CHEN, Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 4, p. 442-446, 2009.

YOU, Y., WEN, D. G., GONG, J. P., LIU, Z. J. Research status of mesenchymal stem cells in liver transplantation. **Cell Transplantation**, v. 28, n. 12, p. 1490-1506, 2019.

YOUNG, H. E., HYER, L., BLACK, JR, A. C., ROBINSON, JR, J. S. Chapter 1: Adult Stem Cells: From Bench-Top to Bedside. In: **Tissue Regeneration: Where Nano-Structure Meets Biology**. 2014. p. 1-59.

ZHAO, Q., REN, H., HAN, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. **Journal of Cellular Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 3-20, 2016.

ZHOU, L. L., LIU, W., WU, Y. M., SUN, W. L., DÖRFER, C. E., FAWZY, K. M., EL-SAYED. Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters. **Stem Cells International**, v. 2020, p. 16, 2020.

ZWINGENBERGER, S., NICH, C., VALLADARES, R. D., YAO, Z., STIEHLER, M., GOODMAN, S. B. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. **BioDrugs**, v. 26, n. 4, p. 245-256, 2012.

ANEXO A

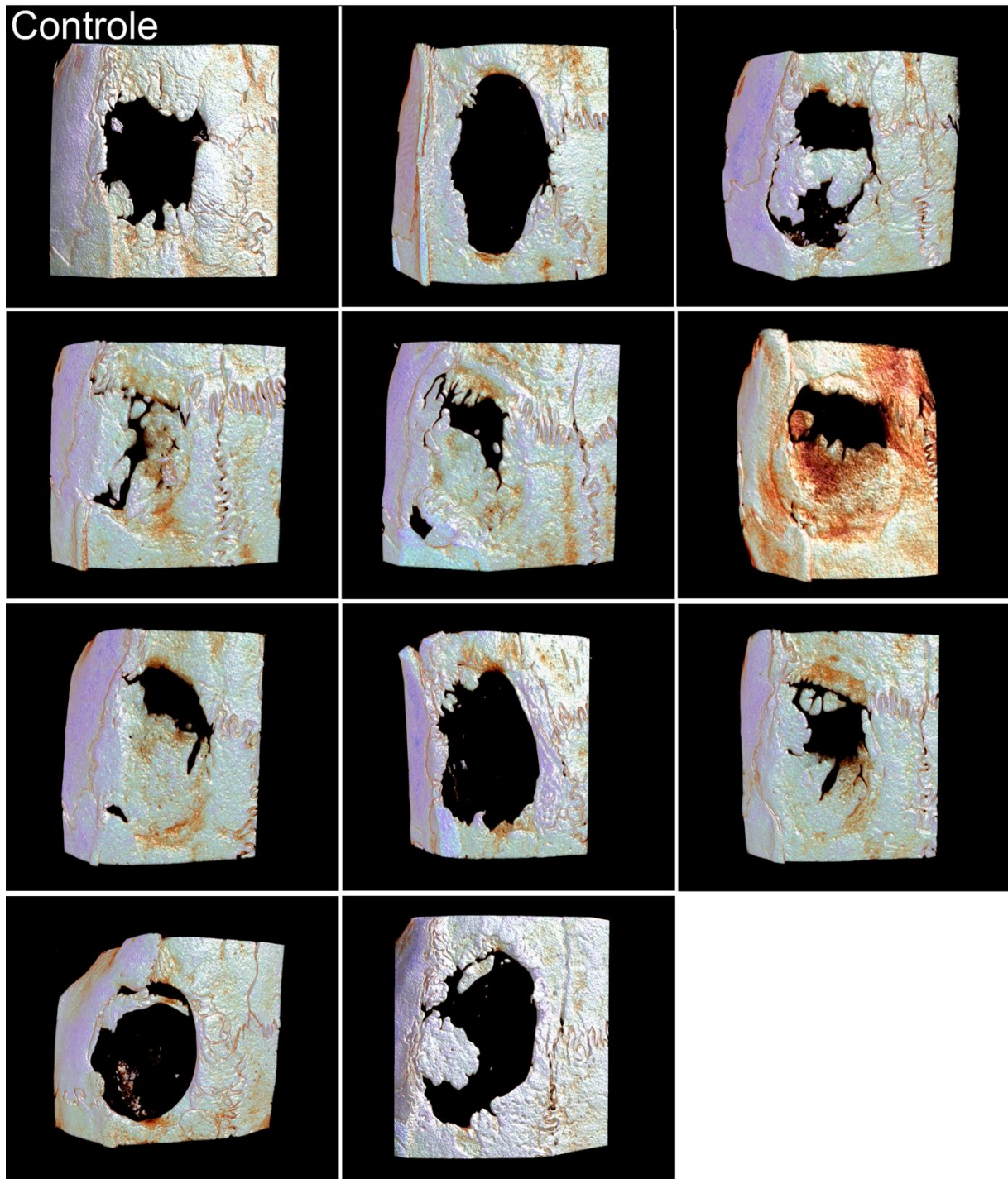


Figura 6. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de PBS (Controle) em 8 semanas (n=11). Barra = 1 mm.

ANEXO B

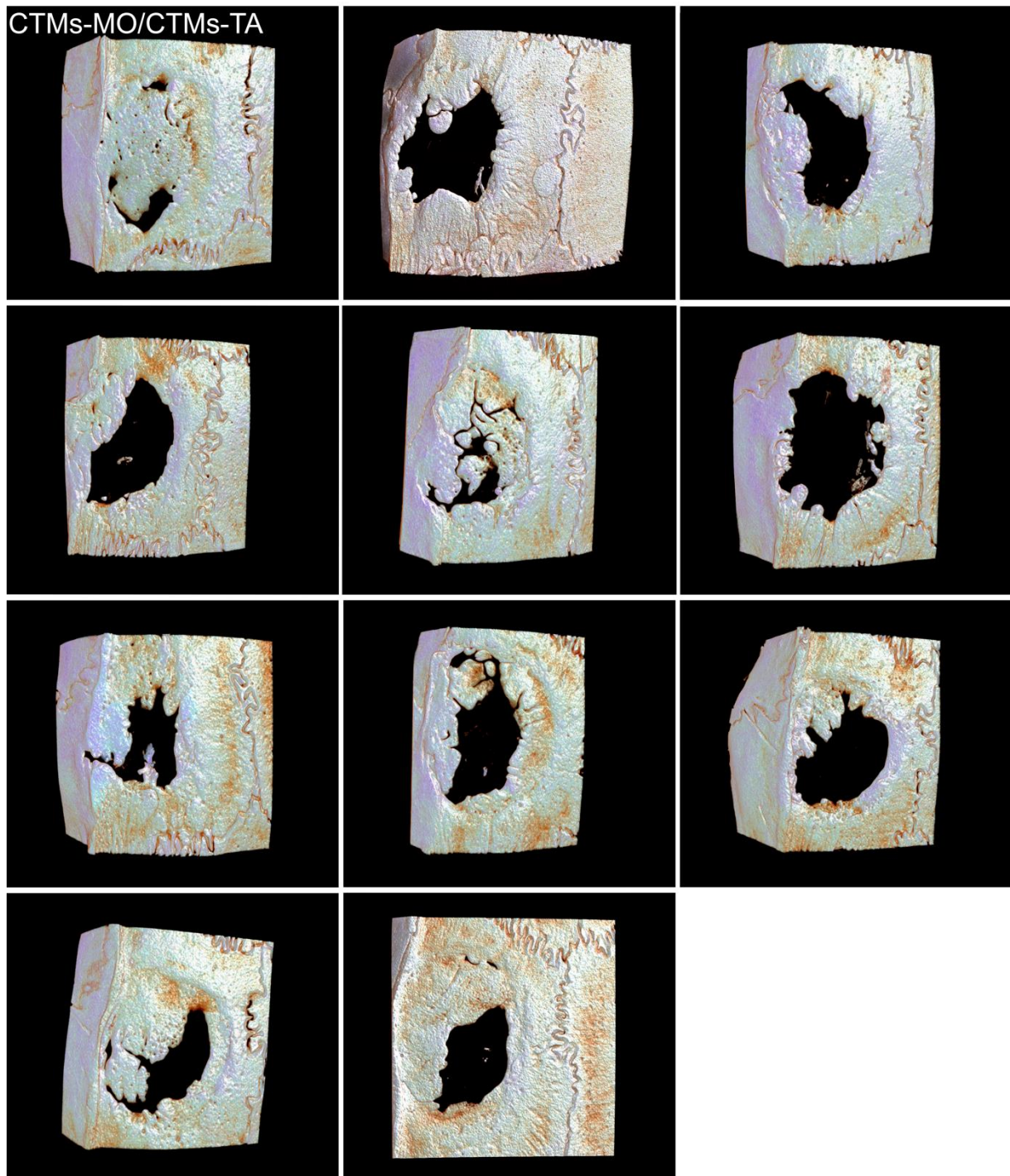


Figura 7. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-MO/CTMs-TA em 8 semanas (n=11). Barra = 1 mm.

ANEXO C

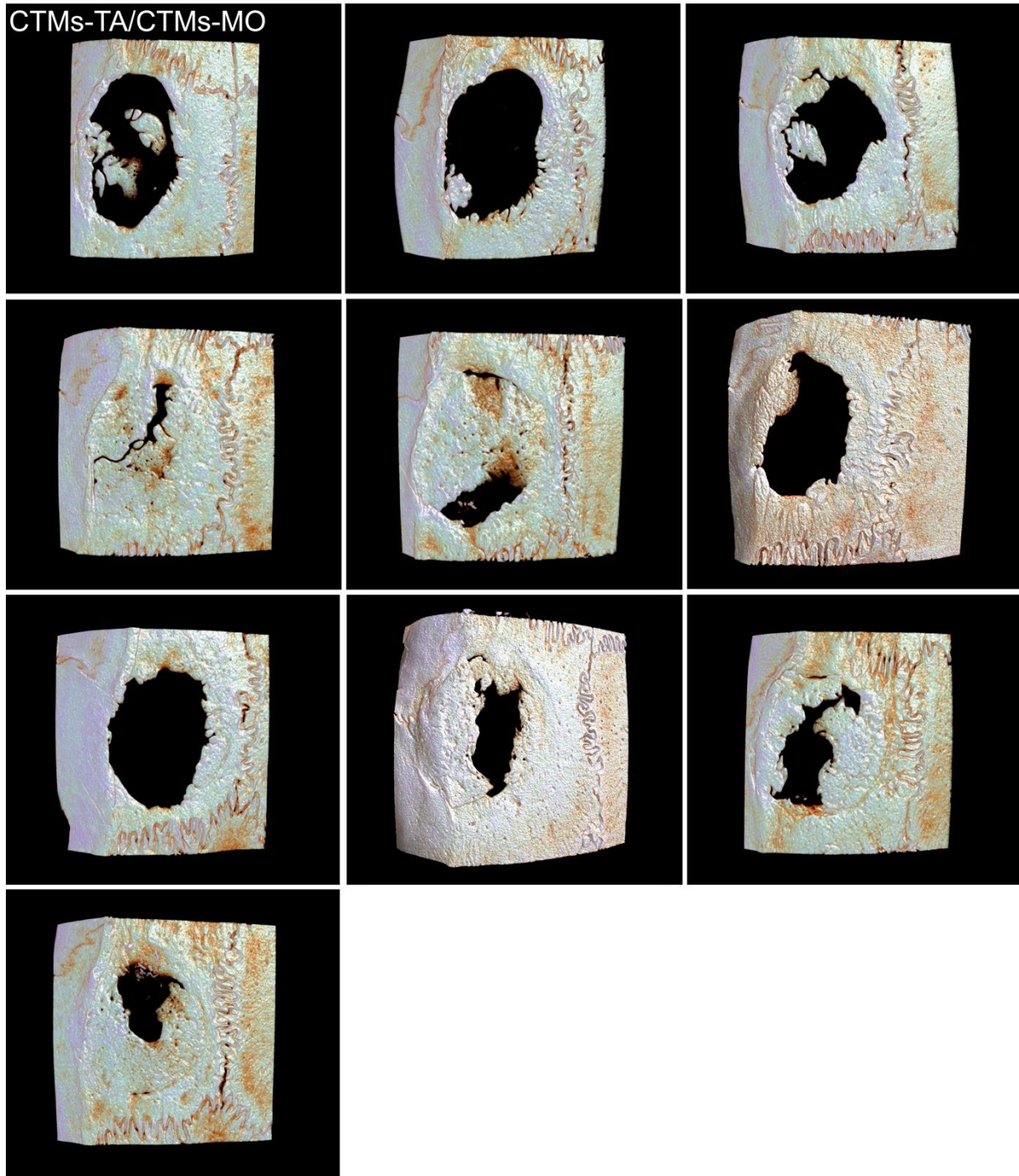


Figura 8. Reconstruções 3D geradas por micro-CT da formação óssea em defeitos de calvária de ratos tratados com injeção local de CTMs-TA/CTMs-MO em 8 semanas (n=10). Barra = 1 mm.

ANEXO D

<small>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO</small> CEUA <small>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO CEUA – FORP/USP	

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do tecido ósseo”, Protocolo nº 2019.1.545.58.9, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 30/09/2019, com alterações aprovadas em 25/10/2019.

Vigência do Projeto	01/10/2019 a 31/07/2021
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Sprague Dawley
Nº de animais	136
Peso/Idade	150 - 200g / 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 25 de outubro de 2019.


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

CEUA - FORP/USP