GABRIELA SOARES KRONEMBERGER

PRODUÇÃO DE ESFEROIDES A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO PARA FABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO *IN VITRO*

DUQUE DE CAXIAS

2018

PRODUÇÃO DE ESFEROIDES A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO PARA FABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO *IN VITRO*

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Leandra Santos Baptista

Dra. Karina Ribeiro da Silva Pereira

DUQUE DE CAXIAS

2018

Kronemberger, Gabriela Soares.

Produção de esferoides a partir de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano para fabricação de tecido ósseo *in vitro*. Duque de Caxias: UNIGRANRIO, 2018.

Orientadoras: Leandra Santos Baptista e Karina Ribeiro da Silva Pereira

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Grande Rio, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, 2018.

Referências bibliográficas: 113-126

 Engenharia de tecido ósseo. 2. Células-tronco de tecido adiposo humano. 3. Esferoides. 4. Osteogênese. 5. Biomedicina Translacional – Dissertação. I. Baptista, Leandra Santos. II Pereira, Karina Ribeiro da Silva. III. Universidade do Grande Rio, Pós-Graduação em Biomedicina Translacional. IV. Título.

ATA DE APROVAÇÃO



As dez horas do dia trinta e um de julho do ano de 2018, no auditório do prédio 32, no instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado initulada "Produção de Esferoides de Células-Tronco/Estromais de Tecido Adiposo Humano para Biofabricação de Tecido Ósseo", de autoria de Gabriela Soares Kronemberger, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação da Prof.* Dr.* Leandra Santos Baptista e Prof.* Dr.* Karina Ribeiro da Silva Pereira. A sessão foi aberta pelo Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'anna Filho e Prof. Dr. Kleber Luiz de Araujo e Souza. Em seguida passou a palavra a candidata para apresentação de sua dissertação. Após apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

<u>APICO presidente declarou</u> a mestranda Gabriela Soares Kronemberger, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – Biotrans. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 31 de julho de 2018.

Drandrag Baptinth Koring Rikard Sile

Prof.* Dr.* Karina Ribeiro da Silva Pereira Orientadora Inmetro

Prof.* Dr.* Leandra Santos Baptista Inmetro Orientadora

Prof.* Dr.* Leonardo da Cunha Boldrini Pereira Inmetro Presidente

25

Prof. Dr. Kleber Luiz de Araujo e Souza UFRJ

Prof. Dr. Celso Barbosa de Santanna Filho Inmetro

Juginice Tome Her

Prof.* Virginia Genelhu de Abreu Coordenadora Geral do Programa

Dedico este trabalho, com amor, à minha família: José Adão, Heloisa, Catarina e Thais, pelo apoio e carinho incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Leandra, pela oportunidade única de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Por estar sempre presente no cotidiano de todos os seus orientandos, disposta a resolver dúvidas teóricas ou práticas, discutir resultados e ouvir nossas ideias para os projetos. Agradeço principalmente por me oferecer um grande amadurecimento pessoal e científico ao longo desses anos de convivência, além de sempre se preocupar para que isso fosse concretizado da melhor forma possível. Muito obrigada!

À minha orientadora, professora Karina, por todos os conselhos e sugestões, por sempre estar disposta para discussões de resultados, resoluções de problemas e nas práticas laboratoriais. Agradeço pela paciência diária e pelo conhecimento admirável repassado ao longo desses anos. Muito obrigada por todo o incentivo e pelas palavras de apoio que me ajudaram tanto a chegar até aqui.

A todos os membros do nosso grupo de pesquisa: Anderson, Ísis, Renata, Letícia, Mayane, Guilherme, Thais e Bianca. Muito obrigada por sempre estarem dispostos para auxiliar em dúvidas, experimentos e sugestões. Vocês são a prova real que não é possível fazer ciência sozinho! Em especial, agradeço à Letícia, que mesmo sendo uma chata, desde o início esteve presente no meu cotidiano, por todas as horas de ajuda, conselhos, companheirismo e amizade.

À coordenadora geral do programa de pós-graduação em biomedicina translacional, Dra. Virgínia Genelhu e à coordenadora professora Carina Boghossian. Em especial, aos secretários Alan e Luanna, pela eficiência e boa vontade na resolução de qualquer pendência.

Ao Dr. Antônio Saraiva, por disponibilizar de seu tempo para me ensinar as técnicas de biologia molecular e por se mostrar sempre disposto a discutir e resolver dúvidas existentes.

A todos os técnicos e alunos do Laboratório de Bioengenharia do INMETRO (em especial Chayenne Santos e Bianca Marigliani) e do NUMPEX-BIO na UFRJ – Polo Xerém, por estarem presentes e muito dispostos a ajudar nos meus experimentos. Em especial, agradeço ao técnico Brunno Verçosa do NUMPEX-BIO, pela paciência e conhecimento repassado no microscópio eletrônico de varredura.

À Mayra Azevedo que disponibilizou com tanta boa vontade seu tempo para me ensinar seu talento único e conhecimento com as técnicas histológicas.

Aos professores que aceitaram gentilmente fazer parte desta banca. Ao Dr. Celso Sant'Anna por aceitar disponibilizar do seu tempo para revisão deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Aniceto e Dr. César Cláudio da Silva por intermediarem a coleta de amostras de lipoaspirado, contribuindo para a realização deste projeto.

Aos doadores que concordaram em prover amostras para que esse projeto pudesse ser realizado.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo auxílio financeiro e pela bolsa de pós-graduação, respectivamente.

À minha família, em especial aos meus pais José Adão e Heloisa e minhas queridas irmãs Catarina e Thais, que nunca mediram esforços pela minha educação, felicidade e realização pessoal. Muito obrigada por toda a renúncia e por estarem presentes em minha vida com amor incondicional e incentivo. Ao meu namorado, Bruno por todo o companheirismo diário, amor e pela enorme compreensão com minhas ausências!

À Deus, por ser força e refúgio em todos os momentos de minha vida.

"O importante é não parar de questionar." (Albert Einstein)

"A persistência é o menor caminho do êxito." (Charles Chaplin)

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação." (Simone de Beauvoir)

RESUMO

KRONEMBERGER, Gabriela Soares. Produção de esferoides a partir de célulastronco/estromais de tecido adiposo humano para biofabricação de tecido ósseo. Duque de Caxias, 2018. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2018.

A nova formação do tecido ósseo é desejável em uma variedade de cenários patológicos, como a osteoporose. Células-tronco/estromais derivadas do tecido adiposo (ASCs, do inglês adipose derived stem/stromal cells) são consideradas uma fonte celular promissora para a formação deste tecido in vitro através de técnicas de engenharia tecidual. Uma nova abordagem na área de engenharia de tecidos corresponde à utilização de esferoides de células-tronco como unidades modulares para fabricar tecidos biológicos in vitro. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar um modelo de indução osteogênica in vitro a partir de esferoides de ASCs humanas fabricados em hidrogel de agarose micromoldado. ASCs foram isoladas por dissociação mecânica de amostras de lipoaspirado humano obtidas de acordo com o comitê local de ética em pesquisa. Duas estratégias para a indução à diferenciação osteogênica foram testadas em esferoides de ASCs fabricados em hidrogel de agarose micromoldado. Esferoides mantidos em meio de cultivo sem fatores indutores foram mantidos como controles. Medidas do diâmetro dos esferoides foram realizadas a partir de imagens de microscopia óptica de contraste diâmetro 370µm e 450µm respectivamente. Esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram alta viabilidade celular (85%), avaliada por exclusão de 7-AAD detectada por citometria de fluxo. Esferoides induzidos por TGF-B3 também apresentaram elevada viabilidade celular ao longo das semanas de cultivo, avaliada por kit comercial de fluorescência. Esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram mais depósitos de cálcio do que os induzidos por hrBMP-7, identificado por coloração de alizarina vermelha em cortes histológicos. Em ambos os casos, as análises por microanálise de raio-X (EDX) mostraram a presença de cálcio apenas em esferoides induzidos. Esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram maior expressão de mRNA de fosfatase alcalina (p = 0.0015) e menor expressão de TSP-1 (p = 0,00016) do que esferoides controles. No entanto, não houve diferença na expressão de RUNX2 e Sox9. Esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram maior composição de componentes típicos da matriz extracelular óssea, como colágeno I, osteocalcina, osteopontina, biglicana e tenascina C, avaliada por imunohistoquímica do que os induzidos por hrBMP-7. Além disso, a resistência mecânica à compressão de esferoides induzidos por TGF-B3 foi superior à de esferoides induzidos por hrBMP-7 (média de 360µN e 20µN, respectivamente). Portanto, foi possível padronizar um modelo de indução osteogênica in vitro de esferoides de ASCs humanas. Conclui-se ainda que a indução por TGF-β3 seguida de indução com meio osteogênico forma esferoides diferenciados com maior eficiência de diferenciação osteogênica do que esferoides induzidos por hrBMP-7. Neste trabalho, foi possível padronizar um modelo de indução osteogênica in vitro de esferoides de ASCs humanas, abrindo uma nova perspectiva para a medicina regenerativa

Palavras-chave: engenharia de tecido ósseo, células-tronco de tecido adiposo humano, esferoides, osteogênese.

ABSTRACT

KRONEMBERGER, Gabriela Soares. Bone tissue biofabrication from human adipose tissue derived stem/stromal cells spheroids. Duque de Caxias, 2018. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2018.

New bone formation is desirable in a variety of pathological settings, such as osteoporosis. Adipose derived stem/stromal cells (ASCs) are considered a promising cell source for the formation of this tissue in vitro through tissue engineering techniques. A new approach in the field of tissue engineering corresponds to the use of stem-cell spheroids as modular units for fabricate biological tissues in vitro. Thus, the aim of this work was to standardize an osteogenic induction model in vitro from spheroids of human ASCs produced by micromolded nonadhesive hydrogel. ASCs were isolated by mechanical dissociation from human lipoaspirate samples obtained according to the local research ethics committee. Two strategies for osteogenic differentiation induction were evaluated in ASCs spheroids produced by micromolded nonadhesive hydrogel. Spheroids maintained in culture medium without inducing factors were maintained as controls. Measurements of spheroid diameter were performed using phase contrast optical microscopy images. Spheroids induced by hrBMP-7 and by TGF- β 3 presented a diameter mean of 370 µm and 450 µm respectively. The hrBMP-7 induced spheroids showed high cell viability (85%), quantified by 7-AAD exclusion detected by flow cytometry. The TGF- β 3 induced spheroids also showed high cell viability throughout the weeks of culture, as assessed by commercial fluorescence kit. The TGF-B3-induced spheroids exhibited more calcium deposits than those induced by hrBMP-7, identified by alizarin red staining in histological sections. In both cases, X-ray microanalysis (EDX) presence calcium only induced showed the of in spheroids. The hrBMP-7 induced spheroids showed higher alkaline phosphatase mRNA expression (p = 0.0015) and lower TSP-1 expression (p = 0.00016) when compared to control spheroids. However, there was no difference in RUNX2 and Sox9 expression. The TGF-B3 induced spheroids had a higher composition of typical extracellular matrix components, such as collagen I, osteocalcin, osteopontin, biglycan and tenascin C by immunohistochemistry when compared to those induced by hrBMP-7. In addition, the mechanical resistance to compression of spheroids induced by TGF-β3 was higher when compared to spheroids induced by hrBMP-7 (mean of 360µN and 20µN, respectively). Therefore, it was possible to standardize an in vitro osteogenic induction model of human ASCs spheroids. It was also concluded that induction by TGF-B3 followed by induction with osteogenic medium is able to produce differentiated spheroids with greater efficiency of osteogenic differentiation than spheroids induced by hrBMP-7. In this work, it was possible to standardize a model of *in vitro* osteogenic induction of human ASCs spheroids, opening a new perspective for regenerative medicine.

Key-words: bone tissue engineering, adipose derived stem cells, spheroids, osteogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais21
Figura 2: Representação esquemática da ossificação intramembranosa25
Figura 3: Visão esquemática do processo de ossificação endocondral26
Figura 4: Regulação da diferenciação de osteoblastos por Runx2 e Osterix29
Figura 5: Representação esquemática dos principais constituintes celulares do
tecido ósseo
Figura 6: Molde de silicone MicroTissues® 3D Dish® (Sigma)44
Figura 7: Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®60
Figura 8: Etapas de produção dos esferoides em hidrogel de agarose
micromoldado61
Figura 9: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os
diâmetros dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 ao longo de 3
semanas de cultivo63
Figura 10: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os
diâmetros dos esferoides controles e induzidos por TGF- β 3 ao longo de cinco
semanas de cultivo64
Figura 11: Viabilidade celular por citometria de fluxo dos esferoides de ASCs
controles e induzidos por hrBMP-765
Figura 12: Viabilidade celular por kit comercial de fluorescência LIVE/DEAD dos
esferoides induzidos por TGF- $\beta 3$ em duas, três e cinco semanas de
cultivo
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de ASCs
controles e induzidos por hrBMP-767
Figura 14: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos esferoides controles e
induzidos por hrBMP-7 após 3 semanas de cultivo68
Figura 15: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos esferoides induzidos por
TGF- β 3 após duas, três e cinco semanas de cultivo70
Figura 16: Expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação
osteogênica e condrogênica por Q-PCR em esferoides controles e induzidos por
hrBMP-771
Figura 17: Coloração por Alizarina vermelha dos esferoides induzidos por
hrBMP-7 após 3 semanas de cultivo72

Figura 18: Coloração de Alizarina vermelha dos esferoides induzidos por TGFβ3 após duas, três e cinco semanas de cultivo.....72 Figura 19: Análise elementar dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7......75 Figura 20: Análise do elemento cálcio na superfície dos esferoides induzidos por TGFβ-3 ao longo de duas, três e cinco semanas de cultivo......76 Figura 21: Composição de N-caderina, colágeno I, colágeno II e colágeno X em esferoides controles e induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7......78 Figura 22: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides controles e induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7.......79 Figura 23: Composição de colágeno II, colágeno VI, colágeno X e TSP-1 em esferoides induzidos por TGF-β3 cultivados durante duas semanas......82 Figura 24: Composição de agrecana e N-caderina em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF-\beta3 cultivados durante duas semanas, além do controle da reação......83 Figura 25: Composição de colágeno I, colágeno X, N-caderina e TSP-1 em Figura 26: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF-β3 cultivados durante três semanas......85 Figura 27: Composição de colágeno I, colágeno X, N-caderina e TSP-1 em Figura 28: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF-\beta3 cultivados durante cinco semanas......87 Figura 29: Quantificação de mediadores solúveis secretados por esferoides Figura 30: Sequência de eventos durante um ciclo completo de compressão de um esferoide no equipamento Microsquisher (Cell Scale)90 Figura 31: Resistência à compressão mecânica dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7.....91 Figura 32: Resistência mecânica dos esferoides de ASCs controles e induzidos por TGF-β3 em duas, três e cinco semanas de cultivo......92

Figura 33: Esferoides induzidos por TGF-β3 como um modelo in vivo de ossificação para promover uma regeneração óssea eficiente......113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais proteínas não colagenosas presentes na MEC do tecido
ósseo e suas funções31
Tabela 2: Componentes do meio de cultivo com suas respectivas
concentrações45
Tabela 3: Componentes da condição 1 do meio de indução osteogênica com
suas respectivas concentrações45
Tabela 4: Componentes da condição 2 do meio de indução osteogênica com
suas respectivas concentrações46
Tabela 5: Anticorpos com as espécies de obtenção e suas respectivas diluições
de uso para o ensaio de imuno-histoquímica54
Tabela 6: Identificação das sequências das sondas utilizadas na reação de PCR
em tempo real56
Tabela 7: Percentual de células mortas (7AAD positivas) dentre os eventosCD90 positivos

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD – (7-Aminoactinomicina D)

ALP - (alkaline phosphatase, fosfatase alcalina)

AMCc - (cyclic adenosine monophosphate, monofosfato cíclico de adenosina)

ASCs – (adipose derived stem/stromal cells, células-tronco/estromais

derivadas de tecido adiposo)

BMP – (bone morphogenetic protein, proteína morfogenética óssea)

BSP – (bone sialo protein, sialo proteína óssea)

CCL5 - (motivo C-C ligante 5)

CD – (cluster of differentiation)

COL I – (colágeno do tipo I)

DMEM – (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose*, meio de *eagle* modificado por dulbecco-baixa glicose)

EDTA – (ethylenediamine tetraacetic acid, ácido etilenodiamino tetra-acético)

EDX – (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, Espectroscopia de raios X por dispersão em energia)

ERK - (*extracellular signal regulated kinases*, cinases reguladas por sinais extracelulares)

hrBMP-7 – (*human recombinante bone morphogenetic protein-*7, proteína morfogenética óssea recombinante humana-7)

HE - (hematoxilina e eosina)

ISCT – (*International Society for Cellular Therapy*, Sociedade Internacional para Terapia Celular)

ITS – (insulina, transferrina e selênio)

MEC - (matriz extracelular)

MEV – (microscopia eletrônica de varredura)

MSCs - (mesenchymal stem cells, células-tronco mesenquimais)

NA – não avaliado

OCN – (osteocalcina)

OPN – (osteopontina)

OSX – (osterix)

PBS – (phosphate buffered saline, salina de fosfato tamponada)

PLA/CHA - (poli (ácido lático)/carbonato apatita)

POC – (primeiro centro de ossificação)

PS – (*penicilin and streptomicin*, penicilina e streptomicina)

RNA – (ribonucleicacid, ácido ribonucleico)

Q-PCR – (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa)

Runx2 – (runt-related transcription factor 2)

SFB - (soro fetal bovino)

SOC - (centro secundário de ossificação)

Sox – (sex determining region Y-box)

SVF - (stromal vascular fraction, fração estromal vascular)

TGF- β – (*transforming growth fator-beta*, fator de crescimento transformante- β)

TSP1 - (Thrombospondin-1, trombospondina-1)

TSP2 - (Thrombospondin-2, trombospondina-2)

VEGF – (*vascular endothelial growth fator*, fator de crescimento endotelial vascular)

Wnt – (Wingless-type MMTV integration site family)/β-catenina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO: CONTEXTUALIZAÇÃO	21
1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	23
1.2 O TECIDO ADIPOSO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	25
1.3 PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	26
1.4 REGULADORES TRANSCRICIONAIS DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	30
1.5 HISTOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	32
1.6 LESÕES NO TECIDO ÓSSEO	35
1.7 BIOMATERIAIS UTILIZADOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA	36
1.8 O USO DE ESFEROIDES PARA FABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO .	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 GERAL	43
3.2 ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSO HUMANO EM SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL	44
4.2 FABRICAÇÃO DO HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO	45
4.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE ASCs EM HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO E INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	46
4.4 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES D ASCs)Е 49
4.5 ANÁLISES DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES DE ASCs	50
4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESFEROIDES: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E EMBLOCAMENTO	51
4.7 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA	52
4.8 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM ALIZARINA VERMELHA	53
4.9 COLETA DE SOBRENADANTE E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORE SECRETADOS POR <i>CYTOMETRIC BEADS ARRAY</i> (CBA)	S 53
4.10 ANÁLISES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ESFEROIDES DE ASC	s 54

4.11 ENSAIO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs
4.12 EXTRAÇÃO DOS mRNAs E ANÁLISE POR Q-PCR DOS ESFEROIDES DE ASCs
4.13 ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ELEMENTAR POR MICROANÁLISE DE RAIO-X (EDX)
5. RESULTADOS
5.1 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs61
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DE VIABILIDADE CELULAR DOS ESFEROIDES DE ASCs CONTROLES E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA62
5.2.1 Esferoides de ASCs induzidos por TGF-β3 apresentam maior diâmetro e homogeneidade de tamanho do que esferoides induzidos por hrBMP-762
5.2.2 Os esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7 e por TGF-β3 apresentam alta viabilidade celular 65
5.2.3 Diferenças na estrutura de superfície dos esferoides controles e induzidos
5.2.4 Diferenças morfológicas entre os esferoides de ASCs controles e os induzidos por hrBMP-7 e por TGF-β3 68
5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs
5.3.1 Expressão de genes relacionados à via de diferenciação osteogênica em esferoides de ASCs induzidos por hrBMP-7
5.3.2 Maior presença de depósitos de cálcio em esferoides de ASCs induzidos por TGF-β3 em relação aos esferoides induzidos por
лгымР-7
5.3.4 Análise de moléculas de matriz extracelular nos esferoides 77
5.3.5 Baixa secreção de mediadores solúveis por esferoides de ASCs induzidos por hrBMP-789
5.3.6 Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica por brBMP-7 apresentam uma baixa resistência à compressão mecânica
ao contrário de esferoides induzidos por TGF-β3
ao contrário de esferoides induzidos por TGF-β3

8. PERSPECTIVA	112
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	127

1. INTRODUÇÃO: CONTEXTUALIZAÇÃO

A maioria das descobertas na área da Biologia Celular e a compreensão da formação e funções de órgãos e tecidos ocorreram a partir do cultivo de células de mamíferos utilizando metodologias de cultivo bidimensionais (2D) tradicionais. Entretanto, como o organismo é um sistema tridimensional (3D) complexo, as técnicas de cultivo 2D de células não são capazes de mimetizar corretamente os sinais mecânicos e bioquímicos que ocorrem *in vivo* (ACHILLI *et al.*, 2012). Em cultivos 2D de células, as interações que prevalecem são aquelas entre as células e o plástico de cultura e não as interações entre as células com a matriz extracelular, as quais são responsáveis pela homeostase do microambiente tecidual, sendo, portanto, essenciais para as funções das células em um tecido (ACHILLI *et al.*, 2012). Na ausência de um arcabouço de fixação, as células irão agregar-se através de moléculas de adesão célula-célula - principalmente caderinas presentes na superfície celular - em um processo denominado automontagem. Durante este processo, ocorre a formação de estruturas 3D denominadas esferoides (DUGUAY *et al.*, 2003).

Os esferoides apresentam diferentes características que os tornam interessantes para a área de medicina regenerativa, como uma elevada adesão devido a uma produção acelerada de matriz extracelular - e serem capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como o fator endotelial de crescimento vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*). Eles já foram avaliados com sucesso para promover a regeneração de cartilagem e de tecido cardíaco (KELM *et al.*, 2010).

Na última década, um grande desafio da área de engenharia tecidual é a fabricação *in vitro* de um construído tecidual de um tamanho compatível com o local a ser substituído e ainda possuir uma elevada densidade de células, semelhante ao encontrado em órgãos naturais (KHADEMHOSSEINI *et al.*, 2006). Esferoides já foram utilizados como blocos de construção para biofabricação de diferentes tecidos (como nervoso e cardíaco) e é crescente a perspectiva para sua utilização em bioimpressão 3D de tecidos autógenos (ELBERT, 2011; BEACHLEY *et al.*, 2014).

É possível fabricar esferoides a partir de diferentes tipos celulares, tais como células tumorais, células-tronco mesenquimais e células-tronco de tecido adiposo humano. Um diferencial em utilizar as células-tronco de tecido adiposo humano é que estas correspondem a uma fonte autóloga e de fácil acesso no momento da coleta do tecido. Além disso, estas células apresentam o potencial para se diferenciarem nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (BAPTISTA *et al.*, 2009), o que torna interessante seu uso em abordagens de engenharia de tecidos.

Um dos tecidos que é amplamente estudado na área de engenharia tecidual é o ósseo. O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo altamente vascularizado, responsável principalmente por promover suporte para os tecidos moles, proteção de órgãos vitais e controlar a homeostase mineral. As principais células deste tecido são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Existem dois processos principais para formação do osso, que são a ossificação intramembranosa e a endocondral, regulados por mecanismos moleculares distintos (FILIPOWSKA et al., 2017). O osso é capaz de se remodelar e regenerar efetivamente após lesões não críticas, ou seja, lesões que são reparadas sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Este processo de regeneração é complexo, altamente regulado e seu sucesso é dependente de angiogênese e de recrutamento de células-tronco mesenquimais (MSCs) (MATHIEU et al., 2013). Neste contexto, as abordagens atuais para o reparo do tecido ósseo em Engenharia de Tecidos são direcionadas para defeitos críticos e fraturas não unidas, as quais não são capazes de serem reparadas espontaneamente (HERRMANN, VERRIER E ALINI, 2015).

O número de casos de lesões ósseas causados por trauma, doenças, deformidade ou degeneração aumentam a cada ano, com uma tendência de continuar progredindo com o passar do tempo pelo aumento da expectativa de vida da população. Dessa maneira, há a necessidade de tratamentos efetivos para promover o reparo funcional do tecido ósseo lesionado (HAO *et al.*, 2017). Ainda que abordagens a partir de enxertos ósseos tenham sido empregadas como um "padrão ouro" de regeneração osteogênica, elas são limitadas pelo potencial de lesionar tecidos saudáveis, pela disponibilidade de tecido do doador e pelo seu elevado custo de materiais sintéticas (JING *et al.*, 2015). Na busca de tratamentos alternativos, estudos com o uso de células-tronco mesenquimais

22

para mediar a regeneração óssea têm sido descritos com resultados satisfatórios em ensaios clínicos. As células-tronco mesenquimais estão sendo utilizadas em associação com biomateriais como abordagem clássica na engenharia óssea (GRAYSON *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2017). Porém, abordagens não clássicas envolvendo o uso de esferoides 3D como um modelo para fabricação de tecido ósseo ainda são pouco exploradas.

1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais ou células-tronco estromais (MSCs, *do inglês Mesenchymal stem cells*) presentes no indivíduo adulto apresentam uma série de funções na manutenção e no reparo de vários tecidos do organismo. Estas células são indiferenciadas e multipotentes para se diferenciar em vários tecidos da linhagem mesodermal (Fig. 1), como ósseo, cartilaginoso e adiposo (PITTENGER *et al.*, 1999; KIM E PARK, 2017).



Figura 1: Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais. As célulastronco mesenquimais são multipotentes, apresentando capacidade de auto-renovação e diferenciação em células da linhagem mesodermal, como células do estroma do conectivo, células do tecido cartilaginoso, adiposo e ósseo. MSC, células-tronco mesenquimais (Adaptado de UCCELLI, MORETTA E PISTOIA, 2008).

Estas células podem ser isoladas a partir do estroma de vários tecidos, como medula óssea (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968, FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970, FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974), tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2002), na parede do

cordão umbilical (ROMANOV *et al.*, 2003), sangue periférico (CHONG *et al.*, 2012), fluido amniótico, placenta (IN 'T ANKER *et al.*, 2003), dentre outros.

Devido à sua potencialidade, as MSCs humanas são consideradas excelentes candidatas para aplicações em medicina regenerativa e já foram aplicadas com sucesso em testes clínicos para o tratamento de diferentes doenças do sistema locomotor, cardiovasculares e neurológicas (POLIMERY *et al.*, 2016).

Em relação às principais vantagens do uso destas células como forma terapêutica, é possível citar a disponibilidade de fontes teciduais para o isolamento das células, o potencial de diferenciação, efeitos imunomodulatórios e parácrinos efetivos e a menor quantidade de complicações éticas para seu uso, quando comparado com as de outras células-tronco, como as de origem embrionária (KIM E PARK, 2017).

Após o isolamento, as MSCs humanas são caracterizadas pela habilidade de aderir na superfície de garrafas de cultura e apresentar morfologia fibroblastóide. No entanto, estas células apresentam uma habilidade limitada de proliferar em cultivos *in vitro* após um certo número de passagens devido à ativação do processo de senescência, o que pode ser considerado um desafio para estudos clínicos que geralmente requerem um grande número de células (KIM E PARK, 2017).

Em condições naturais de injúria tecidual no organismo, as MSCs migram para o sítio inflamatório, onde exercem atividades imuno-modulatórias ao inibir a atividade de células do sistema imune e pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis fator- alpha*) e interferon gama (IFN- γ), agindo dessa forma no reparo do tecido (WANG *et al.*, 2014).

Em relação a aplicações na área de engenharia de tecidos, as MSCs isoladas da medula óssea apresentam um grande destaque por já terem sido utilizadas com sucesso para promover a regeneração de tecidos mesodermais como osso e cartilagem. A capacidade destas células de se diferenciarem e realizarem o reparo de tecidos está intimamente relacionada com uma grande variedade de moléculas bioativas (antiapoptóticas, de indução de proliferação, pró-angiogênicas e imunomodulatórias) secretadas por elas, que podem agir de

24

forma parácrina ou autócrina, provendo assim, um microambiente favorável ao processo de regeneração (POLIMERY *et al.*, 2016).

Dentre as fontes mais utilizadas para o isolamento de MSCs está o tecido adiposo subcutâneo (KIM E PARK, 2017). Quando isoladas deste tecido, são denominadas células-tronco/estromais derivadas de tecido adiposo (ASCs, *Adipose Derived Stem/Stromal Cells*), pois por mais que possam ser consideradas morfologicamente e fenotipicamente similares às MSCs isoladas da medula óssea, apresentam diferenças que a caracterizaram como uma nova população celular, pelo fato de pertencerem a microambientes teciduais e origens distintas (BOURIN *et al.*, 2013 e BAPTISTA *et al.*, 2007). Por serem isoladas do tecido adiposo subcutâneo, o processo se torna minimamente invasivo e a quantidade de células isoladas é elevada (BAPTISTA *et al.*, 2013).

1.2 O TECIDO ADIPOSO COMO FONTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O tecido adiposo branco é encontrado de forma representativa no tecido adiposo subcutâneo e visceral. Este tecido realiza o acúmulo de lipídeos na forma de triglicerídeos como uma fonte energética, além de estar diretamente relacionado com distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade, apresentando uma função endócrina no organismo (TSUJI *et al.*, 2014).

Zuk e colaboradores (2002) introduziram uma população isolada a partir do tecido adiposo branco, as ASCs, utilizando um protocolo de digestão enzimática por colagenase. O isolamento de células-tronco multipotentes a partir deste tecido através desta metodologia é considerado menos invasivo quando comparado com o processo para o isolamento de MSCs a partir da medula óssea, sendo possível inclusive conseguir um maior número de células por amostra de lipoaspirado (BAPTISTA *et al*, 2009). As ASCs apresentam o potencial de diferenciação para as vias osteogênica, condrogênica e adipogênica, representando assim uma fonte celular alternativa às MSCs isoladas da medula óssea, para estudos em medicina regenerativa.

O tecido adiposo subcutâneo consiste predominantemente de adipócitos maduros e de uma fração estromal vascular (SVF, Stromal-Vascular *Fraction*) heterogênea, a qual inclui fibroblastos, células endoteliais, pré-

adipócitos, linfócitos, monócitos e as ASCs (XU *et al.*, 2003), que ficam intimamente associadas aos vasos sanguíneos. Inicialmente, estas células foram isoladas através de protocolo de digestão enzimática por colagenase. Os principais problemas relacionados com este procedimento são o elevado custo da enzima e a dificuldade de aplicação para um volume maior de lipoaspirado. Uma metodologia alternativa corresponde a um processo de digestão mecânica, no qual as ASCs são isoladas em um menor tempo e custo (BAPTISTA *et al.*, 2009).

As ASCs seguem os critérios estipulados pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy* que as definem como células-tronco mesenquimais, as quais têm como características (1) aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultivo *in vitro*, (2) potencial de diferenciação nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica, (3) expressão de marcadores de superfície estromais incluindo CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI *et al.*, 2006). Quando isoladas, as ASCs apresentam marcadores celulares como CD90, CD105, CD73, CD44, CD166 e CD34 (durante os primeiros ciclos de proliferação), e uma falta da expressão do marcador hematopoiético CD45, sendo, portanto, similares fenotipicamente às MSCs isoladas da medula óssea (BAPTISTA *et al.*, 2007). Entretanto, as ASCs apresentam maior estabilidade em culturas *in vitro* de longo período, com uma menor senescência e maior capacidade de proliferação (STRIOGA *et al.*, 2012).

Devido ao seu potencial de diferenciação, as ASCs estão sendo aplicadas atualmente em abordagens *in vitro* e *in vivo* da engenharia de tecidos, para regeneração do tecido ósseo e cartilaginoso. Em relação ao tecido ósseo, estudos de diferenciação *in vitro* a partir de ASCs já foram realizados, porém este processo ainda não foi amplamente explorado a partir deste tipo celular quando comparado com os estudos que utilizaram MSCs derivadas da medula óssea (LINDROOS *et al.*, 2011; CIUFFI, ZONEFRATTI E BRANDI, 2017).

1.3 PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

O esqueleto de mamíferos apresenta três origens embrionárias, (1) o mesoderma paraxial, que origina o esqueleto axial, (2) a placa mesodermal lateral, que forma o esqueleto apendicular e (3) a crista neural axial, que irá

originar os ossos da face. Os dois processos para formação do tecido ósseo ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, correspondendo à ossificação intramembranosa e à ossificação endocondral. Ambos os processos apresentam diferenças morfogenéticas e metabólicas (PAIVA E GRANJEIRO, 2014)

O primeiro processo, ou ossificação direta, ocorre a partir da diferenciação de MSCs em osteoblastos. Em resumo, ocorre inicialmente a condensação das MSCs, seguida da diferenciação direta destas células em osteoblastos e, por fim, a maturação óssea com a formação dos osteócitos aprisionados na matriz mineralizada (Fig. 2). Através do desse processo, ocorre a formação dos ossos do crânio, das partes do esqueleto crânio-facial, de regiões das clavículas e do osso periosteal, que se forma ao redor dos ossos longos para promover o crescimento lateral (VALENTI *et al.*, 2016, PAIVA E GRANJEIRO, 2014).



Figura 2: Representação esquemática da ossificação intramembranosa. Células migrando da crista neural (denominadas células ectomesenquimais, que exibem características mesenquimais) adentram no processo de condensação mesenquimal no sítio do futuro osso (**A**, **B**). Células diferenciam-se em células progenitoras osteocondrais, que se tornam pré-osteoblastos e finalmente, osteoblastos (**C**). Osteoblastos secretam matriz não-mineralizada (osteóide), ocorre enfim o processo de mineralização e essas células são embebidas na matriz óssea. O final da maturação dos osteoblastos ocorre (osteócitos), levando à formação de uma rede de lacunas e canalículos, onde os osteócitos se localizam (**D**) (Adaptado de PAIVA E GRANJEIRO, 2014).

No processo de ossificação endocondral, ou ossificação indireta (Fig. 3), as MSCs se condensam e diferenciam inicialmente em condrócitos, formando um molde de matriz cartilaginosa hialina que sequencialmente será substituído por tecido ósseo vascularizado (VALENTI *et al.*, 2016). O molde de cartilagem hialina cresce de forma intersticial e as células derivadas a partir da região interna do pericôndrio sofrem diferenciação osteoblástica e secretam matriz óssea mineralizada que forma o colar ósseo, subsequentemente tornando-se osso cortical. Os condrócitos no molde de cartilagem proliferam, maturam e hipertrofiam, secretando colágeno do tipo X, fatores pró-angiogênicos e fosfatase alcalina, formando o tecido ósseo mineralizado (MACKIE *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2014). Durante a ossificação endocondral, há a formação dos ossos longos, gerando o esqueleto axial e apendicular (MAES, 2016; PAIVA E GRANJEIRO, 2014).



Figura 3: Visão esquemática do processo de ossificação endocondral. No início da formação óssea, ocorre a condensação de células-tronco mesenquimais (A) que em seguida sofrem diferenciação condrogênica para formação do molde de cartilagem hialina (B). As células no centro do molde de cartilagem hipertrofiam, enquanto que as localizadas na periferia passam por ossificação osteoblástica direta para formar um colar ósseo (C). Células hipertrofiadas iniciam a mineralização da cartilagem rudimentar. Ocorre a invasão de vasos sanguíneos e migração celular, resultando na formação do primeiro centro de ossificação (POC) (D). No final, ocorre a formação do centro secundário de ossificação (SOC), com a periferia mantendo um fenótipo estável de tecido cartilaginoso, a cartilagem articular (E, F) (Adaptado de THOMPSON *et al.*, 2014).

A osteogênese pode ser definida como o mecanismo de diferenciação celular em tecido ósseo através de fatores físico-químicos e de comunicação intracelular, sendo essencial para a formação do esqueleto (MIRON E ZHANG, 2012). Durante a osteogênese, as três principais vias de sinalização envolvidas

são Wnt/β-catenina (*Wingless-type MMTV integration site family*)/β-catenina), Notch e BMP/TGF-β (*Bone morphogenetic protein*/*Transforming growth factor* β). A compreensão destas vias foi de fundamental importância para o entendimento de mecanismos moleculares de reparo e remodelamento do tecido ósseo (MAJIDINIA E YOUSEFI, 2017).

As proteínas Wnt fazem parte de uma família de moléculas secretadas que interagem com os receptores de membrana Frizzled (FZD), resultando na ativação de β -catenina *downstream* (GRUBER *et al.*, 2016). Esta via de sinalização apresenta funções relacionadas com a proliferação celular, diferenciação, crescimento e regeneração óssea (SHI *et al.*, 2016). Dessa maneira, a via Wnt/ β -catenina é envolvida na osteoblastogênese e na função osteoblástica, aumentando a massa de tecido ósseo adulto (CHRISTIE *et al.*, 2017).

A via de sinalização Notch é ativada pela interação dos receptores de Notch (Notch 1-4) e seus ligantes (Delta *like* 1, -3, -4 e Jagged -1, -2). Após a ligação, ocorrem duas clivagens proteolíticas nos receptores e o domínio intracelular de Notch (NICD) é liberado, sendo translocado para o núcleo para ativação transcripcional de genes alvo. Esta via é responsável principalmente por induzir a diferenciação de MSCs em osteoblastos e promover a atividade de fosfatase alcalina (MAJIDINIA *et al.*, 2016; ZU *et al.*, 2013).

As BMPs são fatores de crescimento multi-funcionais que fazem parte da família do TGF-β (CAO E CHEN, 2005). A interação de BMP/TGF-βs com receptores BMP ou serina/treonina TGF-β tipo 1 e tipo 2 inicia cascatas de sinalização dependentes ou independentes de Smad (CARREIRA *et al.*, 2014). As BMPs são capazes de aumentar a indução osteogênica em MSCs, regulando sua proliferação e diferenciação em osteoblastos (MIRON E ZHANG, 2012). As principais BMPs envolvidas com o processo de diferenciação osteogênica em MSCs são as BMP-2, BMP-4 e BMP-7 (ROLDÁN et *al.*, 2010).

Os fatores mais comumente utilizados para promover a osteogênese *in vitro* são a dexametasona, o ácido ascórbico e o β-glicerofosfato. A dexametasona é um esteroide que promove a diferenciação das células em osteoblastos pela ativação da via Wnt/β-catenina. O ácido ascórbico atua como um co-fator para enzimas que hidrolisam a prolina e lisina em colágeno, participando da cadeia de formação desta proteína. Além disso, este fator é um

importante regulador da secreção de colágeno do tipo I, que corresponde ao tipo de colágeno mais encontrado na matriz extracelular do tecido ósseo. O βglicerofosfato é um fosfato inorgânico atuando na diferenciação de MSCs e na expressão de BMP-2 (FREEMAN *et al.*, 2015).

1.4 REGULADORES TRANSCRICIONAIS DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

A osteogênese é um processo altamente regulado através de populações celulares distintas fenotipicamente, a partir de MSCs para um osteoprogenitor comprometido, osteoblastos maduros e por fim, osteócitos terminalmente diferenciados, aprisionados na matriz extracelular mineralizada. Este programa de desenvolvimento é recapitulado *in vitro* com estágios distintos que incluem a proliferação, formação da matriz extracelular e mineralização, que são baseados em perfis de expressão gênica de cada subpopulação de osteoblastos (LIAM *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2017).

Diferentes proteínas nucleares contribuem para a regulação da diferenciação dos osteoblastos e suas funções no microambiente tecidual. Algumas destas proteínas atuam através do esqueleto, outras em um subconjunto de elementos do esqueleto e uma terceira categoria é representada por proteínas que modulam a atividade dos fatores clássicos de transcrição (KARSENTY, 2008).

O Runx2 é um membro da família do domínio Runt de fatores de transcrição e foi mostrado como o determinante molecular da diferenciação osteoblástica. Este gene é considerado o gene máster do processo de osteogênese, primeiramente por regular diretamente a diferenciação de células progenitoras mesenquimais em pré-osteoblastos e por ser necessário para a expressão de proteínas não colagenosas, como é o caso da osteocalcina e osteopontina (MIRON E ZHANG, 2012). Sequencialmente, as células osteo-progenitoras começam a produzir colágeno do tipo I. Diferentes genes foram identificados como controladores da função do Runx2, como é o caso do Twist-1, MSX2, Bapx1 e Stat-1, formando uma rede de fatores de transcrição que regulam a formação óssea de forma complexa (KARSENTY, 2008).

As células osteo-progenitoras se diferenciam parcialmente em préosteoblastos, que são caracterizados pela expressão de fosfatase alcalina (ALP), um marcador inicial da diferenciação destas células e que participa do início da mineralização da matriz óssea (WENNBERG *et al.*, 2000; MIRON E ZHANG, 2012).

Por fim, além do Runx2, outro fator de transcrição envolvido diretamente no processo de diferenciação osteogênica é o Osterix (Fig. 4). A inativação deste fator em camundongos ocasionou uma ausência da formação do tecido ósseo (NAKASHIMA *et al.*, 2002 e KARSENTY, 2008). Diferentemente da ausência do Runx2, que leva à ausência de mineralização no esqueleto, a deficiência de Osterix causa uma perda da matriz mineralizada durante o processo de ossificação intramembranosa, demonstrando a importância deste fator para a diferenciação de osteoblastos (NAKASHIMA *et al.*, 2002 e KARSENTY, 2008).



Figura 4: Regulação da diferenciação de osteoblastos por Runx2 e Osterix. Na osteogênese, o Runx2 é crucial para o comprometimento das células-tronco mesenquimais com a linhagem osteoblástica e influencia positivamente nos estágios iniciais da diferenciação. O Osterix atua na diferenciação osteoblástica após a condensação mesenquimal regulada por Runx2. Durante o processo de diferenciação, o Runx2 está envolvido na expressão de genes da matriz óssea como o colágeno do tipo I (COL I), de Sialoproteina-óssea (BSP, Bone Sialoprotein), Osteopontina (OPN) e Osteocalcina (OCN), além de regular a expressão de fosfatase alcalina (ALP, Alkaline phosphate). Ao final da maturação, ocorre uma baixa expressão de Runx-2. MSC, células-tronco mesenquimais (Adaptado de BRUDERER *et al.*, 2014 e MIRON E ZHANG, 2011).

1.5 HISTOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo altamente vascularizado e inervado que forma, juntamente com a cartilagem, o sistema esquelético. Dentre as funções do tecido ósseo no organismo, três apresentam destaque, que são (1) promover suporte mecânico e ser um sítio para associação de músculos, a fim de haver locomoção, (2) proteger órgãos vitais e a medula óssea, uma vez que esta encontra-se alojada no interior de ossos longos e planos e (3) reservar cálcio e fosfato utilizados para a manutenção da homeostase (BARON, 2008).

É possível encontrar no esqueleto dois tipos de ossos: os planos e os longos, formados por processos embrionários diferentes. A parte externa dos ossos longos é composta por uma camada fina, o córtex ou osso compacto, que corresponde a 80% do osso, o qual progressivamente encontra-se como uma rede de trabéculas calcificadas no interior, formando o osso esponjoso ou trabecular, cujos espaços são preenchidos pela medula óssea (BARON, 2008; BRETT *et al.*, 2017).

As principais células constituintes deste tecido são os (1) osteócitos, que se localizam em cavidades ou lacunas no interior da matriz extracelular mineralizada, (2) osteoblastos, produtores dos constituintes colagenosos e não colagenosos da matriz extracelular e (3) osteoclastos, células que reabsorvem o tecido, sendo responsáveis, portanto, pelo remodelamento ósseo (Fig. 5). Os osteócitos são osteoblastos maduros e correspondem à maior parte da população de células no tecido ósseo (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; SCHAFFLER *et al.*, 2014).



Figura 5: Representação esquemática dos principais constituintes celulares do tecido ósseo. Presença de osteoblastos, que sintetizam matriz óssea mineralizada; os osteoclastos responsáveis pela reabsorção do tecido; os osteócitos, células embebidas pela matriz óssea mineralizada e os osteóides, células imaturas que secretam matriz extracelular neoformada (adaptado de JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

A matriz extracelular do tecido ósseo é composta em aproximadamente 90% por proteínas colagenosas, majoritariamente colágeno do tipo I responsável por promover integridade estrutural e contribuir para a resistência mecânica do tecido - e por proteínas não-colagenosas, sintetizadas em sua maioria pelos osteoblastos. As principais proteínas não colagenosas presentes no tecido ósseo com suas respectivas funções estão listadas na tabela 1 (ROBEY, 2002; BARON, 2008; ALFORD E HANKENSON, 2005). Além da porcão orgânica da matriz extracelular, cristais de hidroxiapatita [3Ca₃(PO₄)₂(OH)₂] são encontrados nas fibras de colágeno e envolvendo esta matriz orgânica, contribuindo para a rigidez estrutural do tecido ósseo (Ross, 2016; Baron, 2008).

Tabela 1: Principais proteínas não colagenosas presentes na matriz extracelular do tecido ósseo e suas funções (BARON, 2008; ALFORD E HANKENSON, 2005).

Proteína	Funções
Osteocalcina	Modula a adesão celular
Osteopontina	Promove a adesão celular e diferenciação osteoblástica
BSP II	Promove a adesão celular e diferenciação osteoblástica
Tenascina C	Promove a diferenciação osteoblástica
Biglicana	Regula o crescimento da fibra de colágeno, a mineralização e formação óssea
TSP1	Regula a atividade dos osteoclastos
TSP2	Inibe a proliferação da MEC e promove a diferenciação osteoblástica

BSP II (*Bone Sialo Protein* II, Sialoproteína óssea II), TSP1 (*Thrombospondin* 1, Trombospondina 1,), TSP2 (*Thrombospondin* 2, Trombospondina 2).

O osso é considerado um tecido metabolicamente ativo, capaz de adaptar-se para ajustar condições de carga impostas ao sistema esquelético diariamente. Esta capacidade é fundamental para a função do esqueleto de proteger os órgãos durante o desenvolvimento (FREEMAN E MCNAMARA, 2016).

Uma problemática relacionada ao tecido ósseo que afeta grande parte da população atual é o grande número de lesões críticas que não regeneram completamente devido à perda de tecido, fixação inapropriada, infecção ou vascularização inadequada (NG *et al.*, 2016).

1.6 LESÕES NO TECIDO ÓSSEO

O reparo de defeitos críticos no tecido ósseo, que não podem ser compensados pela capacidade endógena do organismo, representam um desafio atual para a área de medicina regenerativa (ZIMMERER *et al.*, 2015). Os tratamentos aplicados para lesões osteo-degenerativas representam um gasto elevado para a saúde pública. Como exemplo desta realidade, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 793 bilhões de dólares são gastos anualmente para tratamentos de lesões ósseas (BARABASCHI *et al.*, 2016). No Brasil, uma pesquisa constatou que o gasto do sistema único de saúde (SUS) para o tratamento de osteoporose em idosos é de aproximadamente R\$ 290 milhões de reais, no período de dois anos (MORAES *et al.*, 2014).

O tecido ósseo é extremamente dinâmico, sendo remodelado constantemente pela ação dos osteoclastos e novamente formado pela deposição de matriz mineralizada pelos osteoblastos, em um processo estritamente coordenado por vias de sinalização. Durante este processo, podem ocorrer disfunções, de modo que o equilíbrio entre destruição e formação seja alterado, causando doenças degenerativas no tecido. Alguns fatores podem contribuir para esse desequilíbrio, como a menopausa e o envelhecimento (SOZEN *et al.*, 2017).

A osteoporose é a doença metabólica mais comum em humanos, representando uma problemática para a saúde pública. Ela é caracterizada por perda de massa óssea, onde ocorre deterioração da arquitetura do tecido, comprometendo sua resistência mecânica e consequentemente, gerando um aumento do risco de fraturas (SOZEN *et al.*, 2017).

Outra lesão que pode ser relacionada ao tecido ósseo e ocorre devido ao desgaste é a osteoartrite, uma doença crônica entre as junções caracterizada por perda de cartilagem, inflamação no tecido sinovial e esclerose no osso subcondral (VALDES E SPECTOR, 2010; MARUOTTI *et al.*, 2017). O estágio inicial da osteoartrite é caracterizado por um aumento do remodelamento do tecido ósseo subcondral, enquanto que a redução na reabsorção óssea e o aumento da formação deste tecido ocorre na doença tardia (FINDLAY E ATKINS, 2014; MARUOTTI *et al.*, 2017). Esse remodelamento anormal e a diminuição da

35

mineralização são responsáveis pela alteração na arquitetura do tecido (MARUOTTI *et al.*, 2017).

Com o aumento da expectativa de vida atual, a ocorrência de lesões associadas ao tecido ósseo torna-se mais comum entre a população. Além disso, o risco de fraturas ocasionado por acidentes também é uma problemática para o crescente número de pessoas que habitam grandes centros urbanos. Dessa maneira, há a necessidade do desenvolvimento de abordagens na área de engenharia de tecidos que promovam o remodelamento e a regeneração do tecido ósseo, de modo que ele volte a ser saudável e funcional (ORCIANI *et al.*, 2017).

Atualmente para os tratamentos com lesões ósseas, a estratégia mais empregada corresponde ao uso de enxertos ósseos autólogos (do próprio paciente) ou heterólogos (outro indivíduo da mesma espécie), que podem ser utilizados com outros materiais para promover a regeneração óssea através de osteoindução, osteocondução e osteogênese (NG *et al.*, 2016). No entanto, o uso de enxertos apresenta diferentes limitações, como morbilidade do doador e um suprimento restrito do material (HERRMANN, VERRIER E ALINI, 2015). Como uma alternativa para o uso de enxertos, a aplicação de biomateriais como uma abordagem clássica da engenharia de tecidos para promover o reparo do tecido ósseo, é amplamente explorada (ROSETI *et al.*, 2017).

1.7 BIOMATERIAIS UTILIZADOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Os métodos clássicos da engenharia de tecidos utilizam a abordagem "*top-down*" (de cima para baixo) na qual as células são semeadas em um arcabouço que apresenta propriedades biocompatíveis e biodegradáveis que permitem que elas proliferem e produzam sua própria matriz extracelular com propriedades físicas e químicas semelhantes ao tecido a ser formado (LU *et al.*, 2015). A combinação de células-tronco com biomateriais está sendo considerada atualmente para melhorar a retenção e enxertia destas células após o transplante.

A construção dos arcabouços tridimensionais é tão importante quanto selecionar o tipo celular correto para a regeneração de um tecido de interesse (HINDERER *et al.*, 2015). Geralmente, os arcabouços são feitos a partir de
biomateriais degradáveis e podem ser utilizados como carreadores de células ou de fármacos. Por definição, um biomaterial é um material que apresenta como objetivo interagir com sistemas biológicos para tratar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (O'BRIEN, 2011).

Diferentes biomateriais podem ser utilizados para gerar arcabouços tridimensionais (HINDERER *et al.*, 2015). Os arcabouços apresentam uma função importante para proporcionar o suporte adequado para células proliferarem e manter sua função diferenciada. Além disso, a arquitetura do arcabouço define a forma final do novo tecido a ser regenerado (TAJBAKHSH E HAJIALI, 2016). Um arcabouço ideal deve apresentar quatro características principais (1) uma estrutura tridimensional que favoreça o crescimento celular e o transporte de nutrientes, (2) ser biocompatível e bioabsorvível com um controle adequado de degradação e reabsorção, (3) uma superfície apropriada quimicamente para promover a adesão celular, proliferação e diferenciação, (4) além de propriedades mecânicas favoráveis (TAJBAKHSH E HAJIALI, 2016). Um tipo de material que atende a estes requisitos são os compósitos de polímeros biodegradáveis reforçados com materiais bioativos (TAJBAKHSH E HAJIALI, 2016).

As interações do biomaterial com o tecido hospedeiro ou com as células semeadas ocorrem na interface da superfície do biomaterial com o tecido em escalas nanométricas e micrométricas. Como algumas vezes semear as células no biomaterial não é suficiente para induzir a regeneração e o remodelamento, é necessário que a superfície do material seja ativamente modificada para prover pistas moleculares e físicas a fim de modular as interações das células com a matriz extracelular (LUTOLF E HUBBELL, 2005), são os denominados "materiais inteligentes".

Logo, o processo de modificação da superfície do arcabouço apresenta como principal objetivo construir biomateriais que possam prover respostas biológicas mais pertinentes a partir das células semeadas e das próprias células do hospedeiro. O cenário temporal desejado é que as células no arcabouço produzam sua própria matriz extracelular, a qual deve mimetizar as propriedades do tecido a ser regenerado, de forma concomitante com a absorção do biomaterial por um estímulo controlado do sistema imune e com o desenvolvimento do processo de angiogênese. É importante que o biomaterial

permaneça no organismo durante tempo suficiente para promover o remodelamento tecidual (SILVA *et al.*, 2016).

Diferentes biomateriais estão sendo utilizados para a engenharia óssea, incluindo metais, cerâmicas, compósitos e polímeros naturais, cada um apresentando vantagens e desvantagens. Materiais metálicos, como por exemplo titânio, podem ser utilizados por serem biocompatíveis, resistentes e econômicos. Entretanto, estes não são biodegradáveis e podem induzir estresse nos tecidos. Por outro lado, materiais cerâmicos como hidroxiapatita, estão sendo amplamente utilizados devido à sua bioatividade, que está relacionada com a similaridade estrutural e de composição com a fase mineral do tecido ósseo. Além disso, tais propriedades permitem uma melhor adesão celular e síntese de matriz extracelular óssea. Os polímeros são biocompatíveis e versáteis, sendo divididos em sintéticos e naturais (NGUYEN *et al.*, 2012). Uma estratégia interessante para a engenharia óssea corresponde a combinar materiais cerâmicos com polímeros, formando compósitos, a fim de promover uma maior bioatividade ao arcabouço (DOMINGOS *et al.*, 2017).

Entretanto, abordagens clássicas na engenharia tecidos apresentam desvantagens relacionadas com a menor viabilidade celular no interior dos arcabouços, pela maior dificuldade de difusão de nutrientes, e com a manutenção do controle das propriedades físicas e mecânicas do arcabouço por longos períodos (GUDURIC *et al.*, 2017). Dessa maneira, a biofabricação de tecidos complexos ainda é considerada um desafio, de forma que abordagens não clássicas como a "*bottom-up*" (de baixo para cima), apresentam elevado potencial para atender esta problemática, uma vez que apresenta como objetivo a biofabricação de blocos de construção teciduais e arranjá-los para construir tecidos de maior complexidade (LIU *et al.*, 2013).

Esferoides formados de células podem ser utilizados como blocos de construção para produzir um construído de maior complexidade em uma abordagem "*bottom-up*" da engenharia de tecidos, recapitulando de forma mais fiel *in vitro* o microambiente tecidual encontrado *in vivo*. Uma das propriedades mais interessantes dos esferoides é o fato destes fusionarem entre si quando próximos, o que torna possível construir segmentos de tecidos (MIRONOV *et al.*, 2009).

38

1.8 O USO DE ESFEROIDES PARA FABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO

Os esferoides são estruturas tridimensionais formados a partir do processo de auto-montagem, através do qual as células, na ausência de um arcabouço, interagem diretamente entre si, através de moléculas de adesão, criando um microambiente mais semelhante ao encontrado *in vivo* pela formação de interações mais complexas entre células e das células com a matriz extracelular, recapitulando eventos da embriogênese (ACHILLI *et al.*, 2012).

Os esferoides apresentam diferentes vantagens que os tornam interessantes para a área de engenharia tecidual, como uma elevada adesão celular, devido a uma produção acelerada de matriz extracelular, e serem capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como o VEGF (KELM *et al.*, 2010). Além disso, por apresentarem a capacidade de se fusionarem entre si, podem ser utilizados para a geração de um tecido de maior complexidade (MIRONOV *et al.*, 2011).

Atualmente, um dos maiores desafios da engenharia tecidual é a fabricação *in vitro* de uma grande estrutura com uma elevada densidade de células, semelhante com o que é encontrado em órgãos naturais (LIU *et al.*, 2013). Esferoides já foram utilizados como modelo para a biofabricação de diferentes tecidos (como nervoso e cardíaco) e são propostos para utilização em bioimpressão 3D de tecidos autógenos (ELBERT, 2011; BEACHLEY *et al.*, 2014; BULANOVA *et al.*, 2017).

Outra abordagem que pode ser empregada a partir dos esferoides é utilizá-los como um modelo para o descobrimento e rastreamento de drogas, uma vez que eles mimetizam mais eficientemente o microambiente tecidual *in vivo*. Uma vez que a distância de difusão de uma droga em uma cultura celular de monocamada é menor quando comparada aos tecidos em um organismo, onde a droga precisa penetrar diferentes camadas celulares antes de alcançar uma injúria, como um tumor, os esferoides tornam-se uma abordagem interessante para serem aplicados neste contexto (ACHILLI *et al.*, 2012).

Esferoides fabricados a partir de MSCs ou ASCs de fonte humana ou animal, já foram utilizados em diferentes estudos como um modelo *in vitro* e/ou *in vivo* de regeneração óssea. Quando comparado com o cultivo bidimensional, o processo de diferenciação osteogênica nos esferoides é acelerado, de modo que em três dias de cultivo há modificação na morfologia das células e expressão de proteínas de matriz extracelular específicas do tecido ósseo, como osteocalcina e osteopontina, as quais impulsionam o processo de mineralização (LANGENBACH *et al.*, 2013).

Suenaga e colaboradores (2015) mostraram que os esferoides produzidos a partir de MSCs foram capazes de regenerar o tecido ósseo perdido em um modelo de lesão de calvária em camundongos. No estudo, foi visto que o tecido regenerado recuperou suas propriedades mecânicas e análises de imunohistoquímica evidenciaram a expressão de componentes da matriz extracelular do tecido ósseo.

Laschke e colaboradores (2014) utilizaram ASCs de origem murina para produzir esferoides diferenciados para a via osteogênica. A diferenciação foi evidenciada pela presença de depósitos de cálcio nos esferoides induzidos. Em seguida, estes esferoides diferenciados foram semeados em arcabouços tridimensionais de poli-uretano revestidos com hidroxiapatita e o construído tridimensional foi implantado em um modelo de vascularização em camundongos a fim de verificar se os esferoides poderiam promover a angiogênese no local. No entanto, foi visto que os esferoides diferenciados prejudicaram a capacidade de vascularização, enquanto que os esferoides indiferenciados mostraram uma melhor resposta.

Murphy e colaboradores (2014) utilizaram MSCs para produzir esferoides e os semearam em hidrogel de fibrina para avaliar a capacidade de diferenciação osteogênica. Foi visto que os esferoides expressaram marcadores de diferenciação osteogênica, além de uma secreção elevada de VEGF e baixa mortalidade celular.

No entanto, os trabalhos atuais envolvendo o uso de esferoides *in vitro* para fabricação de tecido ósseo não exploram a dinâmica de diferenciação em relação a presença de diferentes moléculas de matriz extracelular características deste tecido, a expressão de fatores de transcrição e a funcionalidade do modelo, que pode por exemplo, ser avaliada por ensaios de resistência mecânica. Além desses fatores, o uso combinado de esferoides com biomateriais para geração de um construído tridimensional de maior complexidade ainda foi pouco explorado, de forma que há a necessidade de novos estudos para avaliar esta abordagem.

2. JUSTIFICATIVA

A engenharia tecidual é uma área que confere grandes promessas para promover a substituição de tecidos lesados por traumas, doenças ou senectude (TAN *et al.*, 2014). É sabido que o número de habitantes de terceira idade e em senectude aumentará consideravelmente nos próximos anos. Além disso, as populações de jovens que vivem em metrópoles estão mais expostas a lesões traumáticas. Nesse contexto, há a necessidade de promover uma maior qualidade de vida para a população.

O tecido ósseo é um exemplo de alvo de estudo na área de medicina regenerativa, devido a lesões como osteoporose e osteoartrite que estão diretamente relacionadas com o aumento da expectativa de vida populacional e que geram elevados custos para o sistema público de saúde (PINHEIRO et al., 2010; CHEN et al., 2013). A osteoporose é uma doença ósteo-metabólica, caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da arquitetura do tecido ósseo, levando à fragilidade do tecido e aumentando consideravelmente o risco de fraturas. Ela possui uma maior prevalência em mulheres do que em homens, especialmente mulheres após a menopausa devido a mudanças hormonais (GALI, 2001). A osteoartrite é uma doença articular degenerativa, causada por insuficiência da cartilagem, ocasionada por um deseguilíbrio entre a formação e destruição de seus componentes. Essa lesão pode estar associada a uma variedade de condições, como sobrecarga mecânica, alterações bioquímicas e fatores genéticos (COIMBRA et al., 2004). A perda da cartilagem irá aumentar o contato entre os ossos na articulação, o que aumentará o desgaste do tecido devido ao atrito gerado.

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas na área de engenharia tecidual como tentativa de promover a regeneração ou substituição do tecido ósseo lesionado. Uma delas é a realização de transplantes de tecido de fontes autólogas e alógenas, entretanto, existe a limitação de disponibilidade e problemas pós-operatórios associados (YOUSEFI *et al.*, 2015). Outra estratégia é utilizar biomateriais como arcabouços 3D, combinados com MSCs para promover um direcionamento e ancoramento destas células para que estas se diferenciem em células do tecido ósseo no local da lesão, promovendo a regeneração completa. Os biomateriais devem seguir diferentes critérios para

serem utilizados com sucesso, como serem biocompatíveis e bioabsorvíveis (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015). Para promover uma regeneração a longo prazo, fatores de crescimento começaram a ser combinados com MSCs para serem transplantadas juntamente com os biomateriais, porém, não se sabe claramente como essas moléculas agem no local da lesão para causar o reparo do tecido injuriado (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015). Uma outra desvantagem em utilizar essa abordagem baseada em arcabouços é a dificuldade em fazer com que esses construídos teciduais engenheirados sejam fabricados em larga escala, o que é necessário para atender demandas futuras (HUTMACHER, 2001).

A utilização de esferoides formados a partir de células representam uma abordagem interessante para a área de medicina regenerativa, pois apresentam uma intrínseca capacidade de fusão, podem apresentar uma composição complexa, podem ser pré-vascularizados e podem ser biofabricados automaticamente por robotização (REZENDE *et al.*, 2013). Além disso, devido ao fato dos esferoides poderem ser produzidos pelo processo de automontagem, correspondente ao que acontece *in vivo*, eles podem ser utilizados como uma abordagem livre de arcabouços em medicina regenerativa (NAPOLITANO *et al.*, 2007). É importante ressaltar ainda que as tecnologias de biofabricação representam estratégias inovadoras em território nacional.

A partir do contexto apresentado, neste trabalho, foram utilizadas ASCs humanas, que apresentam a capacidade de diferenciação na linhagem osteogênica (BAPTISTA *et al.*, 2009), em um cultivo tridimensional de esferoides utilizando hidrogel de agarose micromoldado para biofabricação de tecido ósseo com elevada viabilidade celular, para aplicações em engenharia de tecidos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Padronizar um modelo de indução osteogênica *in vitro* a partir de esferoides de ASCs humanas fabricados em hidrogel de agarose micromoldado.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer um modelo padronizado de indução osteogênica utilizando esferoides de ASCs com homogeneidade de tamanho e forma.
- Comparar a eficácia do processo de diferenciação osteogênica in vitro em esferoides de ASCs humanas a partir de dois protocolos diferentes de indução.
- Analisar a eficácia de diferenciação dos esferoides de ASCs a partir da detecção de moléculas de matriz extracelular, quantificação de genes e secreção de mediadores relacionados ao processo de osteogênese.
- Avaliar a funcionalidade dos esferoides após indução para a via osteogênica por ensaios de resistência mecânica à compressão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E EXPANSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSO HUMANO EM SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL

As amostras de lipoaspirado subcutâneo foram coletadas de doadores do sexo feminino que possuem entre 18 a 55 anos de idade, saudáveis, não obesos ou com histórico anterior de obesidade (SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017), de acordo com os procedimentos já aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (Protocolo de pesquisa 145/09, anexo I).

As ASCs foram isoladas pelo método de dissociação mecânica estabelecido por nosso grupo de pesquisa (Baptista *et al.*, 2009). Inicialmente, o lipoaspirado foi transferido para tubos de polipropileno de 50mL (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo o mesmo volume do tampão de dissociação ACK (*do inglês Ammonium-Chloride-Potassium*, Lonza, São Paulo, Brasil). Os tubos foram posteriormente agitados com o auxílio de um vórtex durante um minuto, por três vezes. Em seguida, os tubos foram incubados por 15 minutos a 37° C. A suspensão obtida foi centrifugada a 900*g* por 15 minutos e sequencialmente lavada com PBS (*do inglês Phosphate buffer solution*) 0,01M, a fim de separar as células da fração estromal vascular, que sedimentaram, dos adipócitos, que permaneceram no sobrenadante, na região superior dos tubos.

O sobrenadante foi descartado, o sedimento de células foi lavado duas vezes com PBS e semeado (10⁵ células/cm²) em garrafas de cultura em meio quimicamente definido para MSCs humanas (*do inglês Mesenchymal stem cell basal medium – Chemically defined*, Lonza) acrescido de 2% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA) e 10000 U/ml de penicilina sódica com 10000 ug/mL de estreptomicina (Lonza). As culturas foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, a monocamada de células aderidas foi lavada com PBS, a fim de remover células não aderentes e mantida no meio de cultivo para expansão das ASCs. Ao atingir 90% de confluência, a monocamada de células foi dissociada com solução de tripsina 0,125% (Gibco) e 0,78mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, Ácido Tetra acético de Etilediamina, Invitrogen, São Paulo, Brasil) em cinco minutos. Uma fração de células foi

distribuída em garrafa de cultura em uma densidade de 0,8 – 1,3x10⁴ células/cm² para expansão, caracterizando uma passagem, e o restante foi criopreservado em nitrogênio líquido no Laboratório de Bioengenharia Tecidual do INMETRO.

4.2 FABRICAÇÃO DO HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO

Os esferoides foram fabricados em sistema de hidrogel de agarose micromoldado. Para produção deste hidrogel micromolado, foi utilizado um molde de silicone (MicroTissues® 3D Petri Dish®, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) contendo 81 projeções (Fig. 6A), com diâmetro de 800µm cada. Inicialmente, os moldes de silicone foram lavados com água destilada. Em seguida, os moldes foram esterilizados por autoclavação úmida durante 30 minutos à temperatura de 121°C e em seguida foram colocados em estufa para secagem a 60°C *overnight*.

Em seguida, 1g de agarose ultrapura (Invitrogen) foi pesada com o auxílio de uma balança analítica e esterilizada por autoclavação (mesmo período e temperatura citados anteriormente). Concomitantemente, a solução de 0,9% NaCl foi preparada e esterilizada para diluição de agarose em uma solução estéril. Para que fosse possível homogeneizar completamente a solução de agarose ultrapura, esta foi aquecida no micro-ondas em ciclos de 10 segundos até a solução ficar transparente.

Após a diluição completa da agarose, foi dispensado um volume de 550µL da solução de agarose 2% aquecida, no centro de cada molde de silicone. Após 40 minutos, a agarose foi desenformada (Fig. 6C) e dispensada em um poço de uma placa de 12 poços (Kasvi) (Fig. 6D). Após 15 minutos, foi adicionado 2mL de DMEM *low-glucose* para iniciar o procedimento de equilíbrio do hidrogel formado, que foi mantido por 15 minutos em estufa com 5% CO₂ a 37° C. Este processo foi repetido por duas vezes, sendo a última etapa do equilíbrio realizada com meio de cultivo descrito a seguir na tabela 2.



Figura 6: Molde de silicone MicroTissues® 3D Dish® (Sigma). Molde de silicone contendo 81 ressecções (A). Agarose ultrapura (em rósea) adicionada no centro do molde de silicone (B). Processo de retirada da agarose ultrapura solidificada do interior do molde de silicone (C). Hidrogel de agarose micromoldado formado (D) (Adaptado de https://www.microtissues.com).

4.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE ASCs EM HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO E INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Ao atingir a confluência de 90% em monocamada, ASCs em segunda passagem foram dissociadas das garrafas de cultura utilizando solução de tripsina 0,125% e 0,78mM EDTA por 5 minutos. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foi separado um total de $2x10^6$ células em um tubo de polipropileno de 15mL (Kasvi) para cada hidrogel micromoldado fabricado. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 5mL de solução PBS 0,01M em agitação constante de 400*g* por 5 minutos. Posteriormente, o *pellet* formado foi ressuspenso em 120µL em meio de cultivo de manutenção do cultivo tridimensional (Tabela 2). Um volume total de 200µL da suspensão celular foi adicionado no interior do hidrogel de agarose micromoldada de forma constante evitando a formação de bolhas. Após um período de 40 minutos, tempo suficiente para que as células sedimentassem no interior das ressecções por ação da gravidade, foi adicionado um volume de 2mL de meio de cultivo e os moldes foram colocados na estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C por até 24h.

Componentes do meio de cultivo	Concentração de uso
Ácido ascórbico	50µg/mL
ITS (100x)	1x
PS	1000mg/mL
Albumina	1,25µg/mL

Tabela 2: Componentes do meio de cultivo com suas respectivas concentrações.

PS: penicilina e estreptomicina.

ITS: Insulina, Transferrina e Selênio (Sigma).

Após 24 horas, período em que os esferoides concluíram o processo de compactação, foi iniciada a indução para a via osteogênica utilizando dois coquetéis diferentes (Tabela 3 e 4) de meios de indução de diferenciação, sendo um com o objetivo de promover uma indução osteogênica direta (condição 1 de indução) e outro com o objetivo de atingir a diferenciação osteogênica posterior à condrogênese (condição 2 de indução). Para facilitar a descrição dos materiais e métodos e posteriormente dos resultados, a condição 1 de indução foi denominada ao longo do texto a seguir como indução por hrBMP-7 e a condição 2 de indução como indução por TGF-β3. Controles pareados foram realizados mantendo-se os esferoides em meio de cultivo sem nenhum fator de indução. Os fatores de indução utilizados na condição 1 de indução foram Dexametasona (Sigma), β-glicerofosfato (Sigma) e proteína morfogênica óssea recombinante humana 7 (hrBMP-7, human recombinant bone morphogenetic protein 7) durante um período de 3 semanas (Tabela 3). A hrBMP-7 foi gentilmente cedida pela Professora Mari Cleide Sogayar, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana, em uma diferença de 3 dias a cada troca.

Tabela 3: Componentes da condição 1 do meio de indução osteogênica com suas respectivas concentrações.

Componentes da condição 1 do meio de indução osteogênica	Concentração
Ácido ascórbico	50µg/mL
ITS (100x)	1x
PS	1000mg/mL
Albumina	1,25µg/mL
Fatores de indução	Concentração
Dexametasona	10 ⁻⁷ M
β-glicerofosfato	0,8M
hrBMP-7	200ng/mL

ITS: Insulina, Transferrina e Selênio (Sigma).

hrBMP-7: proteína morfogênica óssea recombinante humana 7.

Para a condição 2 de indução, inicialmente foram utilizados os fatores de indução condrogênica, TGF- β 3 (Sigma) e Dexametasona (Sigma), em uma concentração de 10⁻⁷M, durante 2 semanas, de modo que após esse período houve a troca do meio de cultura para os fatores de indução osteogênica, os quais foram o β -glicerofosfato (Sigma) e a Dexametasona (Tabela 4), durante 3 semanas, totalizando um período de 5 semanas de cultivo. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana, em uma diferença de 3 dias a cada troca.

Tabela 4: Componentes da condição 2 do meio de indução osteogênica com suas respectivas concentrações.

Componentes da condição 2 do meio de indução osteogênica	Concentração
Ácido ascórbico	50µg/mL
ITS (100x)	1x

DC	1000ma/ml
PO	rooong/mL
Albumina	1,25µg/MI
Fatores de indução condrogênica	Concentração
TGF-β3	10ng/ml
Dexametasona**	10 ⁻⁸ M
Fatores de indução osteogênica	Concentração
β-glicerofosfato	0,8M
Dexametasona	10 ⁻⁷ M

ITS: Insulina, Transferrina e Selênio (Sigma).

4.4 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES DE ASCs

Para medição do diâmetro maior e menor dos esferoides foram capturadas imagens digitais dos esferoides ao longo das semanas de cultivo, com o auxílio do microscópio óptico invertido equipado com câmera digital (Leica DFC 500). Os diâmetros maior e menor dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 e por TGF-β3 foram determinados com auxílio do *software* AxioVision Rel. 4.6. Em seguida, foi calculada a média aritmética dos diâmetros dos esferoides e a fim de avaliar a homogeneidade de tamanho, foi feito o cálculo da razão entre os diâmetros menor e maior dos esferoides. É importante ressaltar que quanto mais próximo a 1 o valor da razão dos diâmetros, mais próximo ao formato de uma esfera estão os esferoides.

As análises dos esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 foram realizadas a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, foi utilizando o mesmo paciente em uma duplicata experimental.

4.5 ANÁLISES DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES DE ASCs

Para realizar a análise de viabilidade celular, os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 foram inicialmente coletados do interior do hidrogel de agarose micromoldada com auxílio de pipeta e dispostos em tubos de polipropileno de 15mL. Em seguida, foi retirado o meio de cultivo e adicionado 1mL de PBS 0,01M com o intuito de lavar os esferoides e retirar o excesso de meio. Após retirar a solução de PBS, foi adicionado 1mL de colagenase do tipo 1 (Sigma) 1mg/mL diluída em solução de tripsina 0,125% e 0,78mM EDTA. Os tubos contendo os esferoides foram então mantidos a 4°C por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em banho aquecido a 37°C para que os esferoides fossem dissociados mecanicamente a partir do fluxo de meio gerado pela pipetagem. Após dissociação completa dos esferoides, em um período de 20-40 minutos, observada a olho nu, a suspensão de células foi inativada com meio DMEM *low* suplementado com 10% SFB e sequencialmente centrifugada a 900*g* por 15 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em PBS 0,01M e centrifugado novamente na mesma rotação e pelo mesmo período.

Ao final desta etapa, foi realizado o descarte do sobrenadante e o *pellet* foi incubado com o anticorpo monoclonal CD90 acoplado ao fluorocromo APC (Allophycocyanin) (BD Biosciences) para detecção das ASCs por 20 minutos e com o intercalante de DNA 7-*aminoactinomycin* D (7AAD) (BD Biosciences) por 10 minutos, para avaliar quantitativamente a viabilidade celular desta população de interesse. O percentual de células viáveis foi obtido por exclusão da população que apresentou marcação positiva para o intercalante 7AAD. Vinte mil eventos foram adquiridos por amostra em citômetro de fluxo FACSAria III (BD Biosciences) equipado com os lasers azul (488 nm) e vermelho (640 nm). As amostras foram analisadas no *software* FACS Diva versão 8.0. Nesta análise, foram utilizados esferoides de ASCs de 2 pacientes.

A viabilidade dos esferoides induzidos por TGF-β3 foi realizada a partir de marcação de calceína citoplasmática em células vivas e análise da incorporação de homodímero de etídio em células mortas pelo kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD* (Sigma). Inicialmente, os esferoides foram coletados do interior do hidrogel de agarose micromoldado e um total de oito esferoides foram utilizados para a análise, sendo dispostos separadamente no interior de poços de uma

placa de 96 poços (Kasvi). Estes esferoides foram lavados 2 vezes em PBS e sequencialmente mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 10 minutos na solução contendo o marcador *LIVE* (Sigma) de calceína citoplasmática 1:4000 e o marcador *DEAD* (Sigma) de homodímero de etídio 1:1000, ambos diluídos em PBS. Um controle de morte foi realizado de forma pareada, mantendo três esferoides em metanol (Sigma) durante 30 minutos e em seguida, adicionando a solução de *LIVE/DEAD* (Sigma) previamente diluída, após a remoção do metanol. As amostras foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI 6000).

Para os esferoides induzidos por TGF-β3, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente sem replicata experimental.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESFEROIDES: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E EMBLOCAMENTO

Inicialmente, os esferoides foram coletados do interior do hidrogel de agarose micromoldada e lavados 2 vezes com solução de PBS 0,01M. Em seguida, os esferoides foram fixados com paraformoldeído (Sigma) 4% tamponado em PBS 0,01M durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, os esferoides foram lavados 1 vez com PBS 0,01M e 2 vezes com água destilada, sendo posteriormente mantidos por 30 minutos em banhos seriados de etanol (Sigma) 70%, uma vez e etanol 100% 2 vezes, para desidratação. Em seguida, foram realizados dois banhos de 20 minutos em xilol (Sigma), sendo o segundo banho de xilol realizado em estufa a 60°C. Posteriormente, foram realizados 3 banhos em parafina líquida (Sigma), sendo os dois primeiros banhos de 20 minutos e o terceiro de 10 minutos. Por fim, os esferoides foram emblocados em parafina.

Os blocos de parafina contendo os esferoides de ambas as condições foram cortados em micrótomo (Slee Medical – Cut 5062) a fim de obter cortes de 5µm de espessura, coletados em lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma) e lâminas silanizadas (Starfrost®). Os cortes foram utilizados para coloração com Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma), com Alizarina vermelha (Sigma) e para avaliações por imuno-histoquímica, como descrito abaixo. As análises com os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 foram realizadas a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, foi utilizando um único paciente sem replicata experimental.

4.7 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA

Com o intuito de avaliar a morfologia dos esferoides controles e induzidos a partir de ambas as condições, foi realizada a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).

Os cortes foram deparafinizados em estufa a 60°C por 30 minutos seguido de três banhos sucessivos de xilol de 3 minutos cada, sendo o primeiro banho em estufa a 60°C e os demais à temperatura ambiente. Em seguida, foi iniciado o processo de reidratação dos cortes em banhos decrescentes de etanol por 2 minutos cada. Os cortes foram sequencialmente lavados em água destilada por 3 minutos e ao final deste período, corados com solução 1:4 Hematoxilina de Harris (Sigma) em água destilada por 3 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em filete de água corrente por 5 minutos e por 3 minutos em água destilada. Em seguida, os cortes foram corados em Eosina alcoólica (Sigma) por 45 segundos. Posteriormente, foram iniciadas as etapas de desidratação dos cortes a partir de um banho em etanol 95% e dois banhos em etanol 100%, cada uma com duração de 2 minutos. Os cortes foram sequencialmente clarificados em três banhos de xilol, com duração de 3 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas em Entellan (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os cortes corados foram analisados no modo campo claro em um microscópio óptico equipado com câmera digital (Leica DM 2500).

Para os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 as análises foram realizadas ao final do período de cultivo e a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente sem replicata experimental.

52

4.8 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM ALIZARINA VERMELHA

Com o intuito de avaliar a presença de depósitos de cálcio típicos do processo de diferenciação osteogênica, nos esferoides induzidos a partir de ambas as condições de indução foi realizada a coloração por Alizarina vermelha (Sigma).

Inicialmente, foram seguidas as mesmas etapas de desparafinação e reidratação descritas no tópico 4.6. Ao final do processo de reidratação, os cortes foram corados com Alizarina vermelha por 7 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos, contra-corados com solução 1:4 Hematoxilina de Harris em água destilada por 30 segundos e lavados em filete de água corrente por 5 minutos. Posteriormente, foram seguidas as mesmas etapas de desidratação, clarificação, montagem e observação das lâminas descritas no tópico 4.6.

Para os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 as análises foram realizadas ao final do período de cultivo e a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, as análises foram realizadas ao final da terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente sem replicata experimental.

4.9 COLETA DE SOBRENADANTE E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES SECRETADOS POR CYTOMETRIC BEADS ARRAY (CBA)

Foi avaliada a presença de IL-6, RANTES e VEGF no sobrenadante dos esferoides induzidos por hrBMP-7 e da condição controle pelo método *cytometric bead array* (CBA, BD Biosciences).

Vinte e quatro horas antes da coleta do sobrenadante das culturas de esferoides das condições controle e induzidos por hrBMP-7 foi realizada a troca do meio de indução pelo meio de cultivo sem nenhum fator indutor. Essa etapa foi realizada para não haver interferência na quantificação dos mediadores secretados, pela presença dos fatores de indução no meio de cultivo. Um volume de 1,5mL de sobrenadante foi coletado e distribuído em tubos do tipo *eppendorf*, cada um contendo 100µL do sobrenadante coletado. Em seguida, os tubos foram armazenados a -80° C.

O ensaio de CBA foi realizado conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, foi feita a reconstituição dos padrões de IL-6, RANTES e VEGF para preparo de um tubo padrão de concentração conhecida. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada deste padrão para formar uma curva padrão de concentração dos analitos a serem avaliados. Em seguida, 25µL de cada sobrenadante dos esferoides induzidos por hrBMP-7 e da condição controle em tubos do tipo *eppendorf* e 25µL da mistura de *beads* de captura previamente homogeneizada foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente. O mesmo volume de beads de captura foi incubado nas amostras da curva padrão. Após este período, foram adicionados 25µL da mistura dos reagentes de detecção PE (phycoeritrina) em todos os tubos, seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 500µL do tampão de lavagem nos *eppendorf*s de ensaio, os quais foram centrifugados a 200*g* por 5 minutos. Ao final da centrifugação, os sobrenadantes foram descartados para adicionar 150µL do tampão de lavagem em cada *eppendorf*.

As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSAria III, BD Biosciences), sendo adquiridos 300 eventos por analito avaliado. Os dados foram analisados utilizando o *software* FCAP 3.0. Este ensaio foi realizado a partir de 3 pacientes para cada condição experimental ao final das três semanas de cultivo.

4.10 ANÁLISES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ESFEROIDES DE ASCs

Com o objetivo de analisar a eficácia da diferenciação osteogênica nos esferoides de ASCs, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais para identificar moléculas características da matriz extracelular do tecido ósseo e relacionadas a esta via de diferenciação. Além disso, foram feitas análises para observar a presença de moléculas de adesão celular. A marcação foi realizada com os cortes dos esferoides induzidos de ambas as condições experimentais e da condição controle.

Os cortes para imuno-histoquímica foram coletados em lâminas silanizadas (Starfrost®). As amostras foram deparafinizadas 3 horas na estufa a 60°C seguido de dois banhos de xilol, de 5 minutos cada. Os cortes foram hidratados em banhos seriados de etanol em concentrações decrescentes: 2

banhos de álcool 100% de 5 minutos cada, seguido de 2 banhos de 5 minutos de álcool 70% e um único banho de álcool 50% por 5 minutos. Ao final da reidratação, os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos.

Em seguida, foi feita uma etapa de recuperação enzimática de sítios antigênicos utilizando a enzima Condroitinase ABC 0,01% (Sigma) por 30 minutos a 37° C, conforme recomendação do fabricante, para os cortes que foram marcados com anticorpos anti-humanos para Tenascina-C, Colágeno I, Colágeno II, Colágeno X e TSP-1 (todos da Abcam, Cambridge, UK). Esta etapa não foi necessária para os demais alvos avaliados.

A reação de imuno-histoquímica foi realizada utilizando-se um kit da Biogen (Spring – Cód. SPD-125). Inicialmente, as amostras foram submetidas aos bloqueios de proteína (BSA 0,5%, caseína 0,5% e azida de sódio 0,1%) em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena e o bloqueio de proteínas, com o intuito de evitar marcações inespecíficas.

Após as etapas de bloqueio, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 1 hora. Os anticorpos primários, com a espécie de obtenção, utilizados com as diluições correspondentes estão apresentados na tabela 5.

Anticorpos	Espécie de obtenção	Diluição de uso
Colágeno I	Mouse	1:100
Colágeno II	Mouse	1:50
Colágeno VI	Mouse	1:200
Colágeno X	Mouse	1:50
N-Caderina	Mouse	1:800
Osteocalcina	Mouse	1:200

Tabela 5: Anticorpos com as e	espécies de obtenção e suas	respectivas diluições de uso
para o ensaio de imuno-histoq	luímica.	-

Osteopontina	Mouse	1:100
Tenascina C	Mouse	1:4000
TSP-1	Mouse	1:10
Biglicana	Mouse	1:200

Ao final deste período, os cortes foram lavados em tampão PBS com *Tween* 10x e o reagente *Complement* (Spring), que consiste nos anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho, foi adicionado por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados novamente em tampão e então incubados por 10 minutos com o reagente *Conjugate* (Spring), que consiste em um polímero que promove a ligação da estreptavidina com o anticorpo secundário. Por fim, os cortes foram novamente lavados com tampão e incubados por 5 minutos com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Spring). Todas as etapas descritas foram realizadas em temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram cuidadosamente lavados com solução de 1:4 Hematoxilina de Harris em água destilada durante 3 minutos. Ao final deste período, as amostras foram lavadas em filete de água corrente por 5 minutos, desidratadas em banhos seriados de concentrações de álcool crescentes: etanol 50%, 70% (duas vezes) e 100% (2 vezes) e clarificados em 3 banhos de xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas em *Entellan*.

Para os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 as análises foram realizadas a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente sem replicata experimental.

4.11 ENSAIO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs

A resistência mecânica à compressão dos esferoides controles e induzidos a partir de ambas as condições, foi avaliada utilizando o equipamento Microsquisher (Cell Scale, Waterloo, Canadá). Nesta análise, após os esferoides

serem coletados do hidrogel de agarose micromoldado, o meio de cultura foi removido e estes foram lavados com 1mL de PBS 0,01M. Em seguida, um esferoide foi disposto, com auxílio de pipeta, na plataforma do equipamento, que se mantém imergida com PBS a 37°C durante o ensaio. Em seguida, uma placa posicionada acima do esferoide exerceu 5 ciclos de compressão, que corresponde a uma força vertical com amplitude de 25% do diâmetro do esferoide. O equipamento dispõe de uma ferramenta para medição do diâmetro, o que torna possível aplicar a força vertical com esta amplitude. Cada ciclo foi composto de uma fase de carga de 20 segundos, seguida de recuperação de 10 segundos, sendo a força de resistência a compressão medida em µN a cada ciclo, em um total de cinco ciclos.

Para os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 as análises foram realizadas ao final do período de cultivo e a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF-β3, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente em uma duplicata experimental. Neste ensaio, para cada semana de cultivo analisada da indução por TGF-β3, também foi mantida em cultivo uma condição controle, para ser possível realizar posteriormente a comparação dos resultados com esta condição.

4.12 EXTRAÇÃO DOS mRNAs E ANÁLISE POR Q-PCR DOS ESFEROIDES DE ASCs

A fim de avaliar a expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica, foi realizada a extração dos mRNAs dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7.

Inicialmente, os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, cultivados durante três semanas, foram coletados do interior do hidrogel de agarose micromoldada. Em seguida, os esferoides coletados em tubos de polipropileno de 15mL, foram lavados em 1mL de PBS 0,001M dissociados conforme descrito no tópico 4.5. Ao final desta etapa, foi adicionado 350µL da solução de RLT proveniente do kit QIAGEN RNeasy® (Applied Biosystems, USA) e a suspensão de células foi rompida com a ação mecânica conjunta de uma seringa (BD Biosciences) de volume de 1mL. Em seguida, foram iniciadas as etapas do kit

QIAGEN RNeasy® para o isolamento do mRNA seguindo as recomendações do fabricante. Ao final do processo, o mRNA isolado foi quantificado utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific).

Para a reação de Q-PCR, foram utilizadas as sondas humanas de Colágeno do Tipo I (COL1A1), fosfatase alcalina (ALP, do inglês *alkaline phosphatase*), Runx2 - alvos diretamente relacionados à via de diferenciação osteogênica - Sox9 - gene regulador do processo de diferenciação condrogênica - e trombospondina 1 (TSP-1, do inglês *thrombospondin* 1). Além disso, foi utilizada a sonda do gene constitutivo RPLP0 nas reações. Todas as sondas foram adquiridas através da Thermofisher Scientific. Na tabela 6 é possível visualizar as identificações das sequências de cada sonda utilizada.

Sondas	Identificação das sequências
COL1A1	Hs00164004_m1
ALPL	Hs01029144_m1
Runx2	Hs01047973_m1
Sox9	Hs00165814_m1
TSP-1	Hs00962908_m1
RPLP0	Hs99999902_m1

 Tabela 6: Identificação das sequências das sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real.

Para iniciar a reação, em resumo, foi utilizado 1,5µL do RNA total (15ng/µL) e este foi amplificado em *master mix* composto por 5µL de 2x RT-PCR buffer, 0,4µL de 25x RT-PCR *enzyme mix* e por fim, a solução de *master mix* foi completada com água livre de nucleases para um volume final de 33µL. Primers específicos e sondas (Tabela 6) específicas TaqMan (Applied Biosystems) foram utilizadas. Foi realizado a triplicada para cada amostra de RNA. A reação foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 para PCR em tempo real com um total de 40 ciclos.

Para os esferoides controles, cultivados durante três semanas, e induzidos por hrBMP-7 as análises foram realizadas ao final do período de cultivo e a partir de 2 pacientes diferentes.

4.13 ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ELEMENTAR POR MICROANÁLISE DE RAIO-X (EDX)

Com o objetivo de observar a ultraestrutura da superfície dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, foram realizadas análises por MEV, além de uma análise elementar por microanálise de raios-X (EDX) a fim de obter um resultado semi-quantitativo da presença do átomo de cálcio, por comparação relativa. A análise por EDX foi realizada para os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 e TGF-β3.

Inicialmente, os esferoides foram coletados do hidrogel de agarose micromoldado e lavados com PBS 0,01M por 5 minutos. As amostras foram então fixadas em glutaraldeído (Sigma) 2,5% em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M por 2 horas ao abrigo da luz. Posteriormente, os esferoides foram lavados com o tampão cadodilato de sódio por 5 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio (Sigma) 1% diluído em cacodilato de sódio 0,1M e mantidos por 30 minutos ao abrigo de luz. Sequencialmente, os esferoides foram lavados 3 vezes por 5 minutos com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, os esferoides foram desidratados por lavagens seriadas em soluções de etanol de 10 minutos cada, nas concentrações de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente. Após a desidratação, as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico (Leica/CPDO30) e, posteriormente, recobertas com 10nm de ouro pelo equipamento sputtering (DENTON VACUUM). Para as análises de espectro e mapeamento dos elementos por EDX, as amostras foram somente fixadas em glutaraldeído (Sigma) 2,5% em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M, secas a temperatura ambiente e recobertas com carbono.

As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (VEGA3 TESCAN) em uma voltagem de 5.0 kV. Para a microanálise de raios-x, o detector utilizado foi o Oxford X-MaxN 20 mm² e o parâmetro de tempo morto

foi de 15-20%. Para os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, as análises foram feitas ao final de três semanas de cultivo a partir de 3 pacientes. Para os esferoides induzidos por TGF- β 3, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semana de cultivo, utilizando o mesmo paciente sem replicata experimental.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 e entre esferoides controles e induzidos por TGF- β 3 foi realizada utilizando o teste t de *student* não pareado e não paramétrico Mann-Whitney. Para os resultados de Q-PCR com esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, foi aplicado o teste t de *student* múltiplo. As comparações dos esferoides controles e induzidos por TGF- β 3 em duas, três e cinco semanas de cultivo foram realizadas a partir da análise por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado. Os resultados nos gráficos foram expressos como média ± erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *p* < 0.05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs

Para a produção de esferoides, inicialmente foi realizada a fabricação do hidrogel de agarose micromoldado a partir do molde de silicone *3D Petri Dish*® (Fig. 7). Cada hidrogel de agarose micromoldado formado apresenta um total de 81 ressecções, de forma que um total de 81 esferoides foram formados após a etapa de semeadura de células.



Figura 7: Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®. (A) Molde de silicone 3D Petri Dish® contendo 81 projeções em sua região central. (B) Molde de silicone após ter sido dispensada a agarose em seu interior. A seta aponta a região em que a agarose se deposita após ser dispensada. Barra de escala de 1cm. (C) Hidrogel de agarose micromoldada desenformada do molde, contendo 81 ressecções. (D) Hidrogel de agarose micromoldada inserida no poço da placa de cultura com meio de cultura.

Os esferoides individualizados nas ressecções foram fabricados em um período de 24h a partir das ASCs em monocamada (Fig. 8). Ao final deste período, a compactação celular foi concluída, sendo possível visualizar os esferoides a olho nu no hidrogel de agarose micromoldado.



Figura 8: Etapas de produção dos esferoides em hidrogel de agarose micromoldado. (A) Monocamada de ASCs com morfologia fusiforme após 4 dias de cultivo em segunda passagem. (B) Células sedimentadas no interior de uma única ressecção 40 minutos após a etapa de semeadura destas células. (C) Compactação das células após 24 horas da semeadura das ASCs. Barra de escala de 100µm.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DE VIABILIDADE CELULAR DOS ESFEROIDES DE ASCS CONTROLES E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA

5.2.1 Esferoides de ASCs induzidos por TGF-β3 apresentam maior diâmetro e homogeneidade de tamanho do que esferoides induzidos por hrBMP-7

Para analisar o tamanho e a homogeneidade do tamanho dos esferoides ao longo do tempo e entre as duas condições de indução osteogênica, foi realizada a medição dos diâmetros maior e menor dos esferoides e o cálculo da razão entre estes diâmetros (Fig. 9 e 10).

Em 0 h do experimento de indução com hrBMP-7, foi observado que os esferoides controles apresentaram uma média de diâmetro superior a 400µm, que decaiu para uma média de 350µm em 2 semanas com uma recuperação para uma média de 360µm em 3 semanas. Houve uma diferença estatística entre os esferoides controles em 0 h e controles em 1 semana (p = 0,0320), 2 semanas (p < 0,0001) e 3 semanas (p = 0,0002) (Fig. 9I). Os esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram uma média de diâmetro inferior aos esferoides controles durante o cultivo. Houve diferença estatística significativa somente entre os esferoides induzidos em 0 h e 1 semana de cultivo (p = 0,0178). Não foi observada diferença estatística entre a condição controle e induzida por hrBMP-7 ao longo do cultivo (p > 0,2365). Não houve diferença significativa na razão entre os diâmetros dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 e ao longo do tempo de cultivo (p > 0,2421) (Fig. 9J).

Já com relação à indução com TGF- β 3, foi observada uma diferença de média de diâmetro entre esferoides induzidos e não-induzidos a partir da terceira semana de indução até o final do experimento (Fig. 10K). Após três semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram uma média de diâmetro de 395µm, ao passo que os esferoides induzidos por TGF- β 3 tiveram uma média de diâmetro de 450µm. Em quatro semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram uma redução em seu diâmetro para uma média de 360µm e os esferoides induzidos por TGF- β 3 mantiveram a média de diâmetro de 450µm. Já em cinco semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram uma redução em seu diâmetro para uma média por TGF- β 3 mantiveram a média de diâmetro de 450µm. Já em cinco semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram uma redução em seu diâmetro para uma média de 330µm e os esferoides induzidos por TGF- β 3 mantiveram suas médias de diâmetro em 450µm. Estas diferenças entre o diâmetro de esferoides induzidos e não induzidos a partir da terceira semana foi significativa (p = 0,0333, p < 0,0001 e p < 0,0001 para terceira, quarta e quinta semana, respectivamente).

Sendo assim, houve uma tendência de diminuição do diâmetro dos esferoides não induzidos (controle) a partir da terceira semana, o que não foi observado para os esferoides induzidos por TGF- β 3 (Fig. 10K). Não houve diferença significativa das razões de diâmetro entre os esferoides induzidos por TGF- β 3 e não-induzidos ao longo do tempo de cultivo (p > 0, 1754) (Fig. 10L).



Figura 9: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os diâmetros dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 ao longo de 3 semanas de cultivo. Esferoides da condição controle após 0h (A), 1 semana (B), 2 semanas (C) e 3 semanas de cultivo (D). Esferoides da condição induzida após 0h (E), 1 semana (F), 2 semanas (G) e 3 semanas (H) de cultivo. Barra de escala de 100µm. (I) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7. (J) Valores de razão entre os diâmetros menor e maior dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7. Os asteriscos indicam valores de *p* obtidos por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0005; **** p<0,0001).



Figura 10: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os diâmetros dos esferoides controles e induzidos por TGF- β 3 ao longo de cinco semanas de cultivo. Esferoides da condição controle após 1 semana (A), 2 semanas (B), 3 semanas (C), 4 semanas (D) e 5 semanas de cultivo (E). Esferoides da condição induzida após 1 semana (F), 2 semanas (G), 3 semanas (H), 4 semanas (I) e 5 semanas de cultivo (J). Barra de escala de 100µm. (K) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides controles e induzidos por TGF- β 3. (L) Valores de razão entre os diâmetros dos esferoides controles e induzidos por TGF- β 3. Os asteriscos indicam valores de *p* obtidos por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* *p*<0,05; ** *p*<0,001; *** *p*<0,0005; **** *p*<0,0001).

5.2.2 Os esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7 e por TGFβ3 apresentam alta viabilidade celular

A fim de avaliar a viabilidade das células nos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 cultivados durante 3 semanas, foram realizadas análises por citometria de fluxo utilizando-se o marcador de morte celular 7AAD para a população celular positiva para o marcador mesenquimal CD90 (Fig. 11).

Esferoides não induzidos apresentaram viabilidade celular elevada, uma vez que somente 4,6% da população celular apresentou marcação positiva para 7AAD (Fig. 11B, Tab. 7).

Esferoides induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7 apresentaram viabilidade celular inferior à condição controle, uma vez que 11,1% da população celular apresentou positividade para o intercalante 7AAD (Fig. 11C, Tab.7).



Figura 11: Viabilidade celular por citometria de fluxo dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7. (A) Controle negativo. (B) População celular referente a condição controle com marcação para CD90 e 7AAD. (C) População celular referente a condição induzida com marcação para CD90 e 7AAD. Nos gráficos em (B) e (C), Q1 se refere à população de células CD90 positivas e 7AAD negativas. Q2 se refere à população de células CD90 positivas e 7AAD negativas. Q3 se refere à população de células negativa para CD90 e 7AAD. Q4 se refere à população de células CD90 negativas e 7AAD positivas e 7AAD positivas e 7AAD positivas e 7AAD positivas.

 Tabela 7: Percentual de células mortas (7AAD positivas) dentre os eventos CD90 positivos.

Condição	Células CD90+ 7AAD+ (%)
Controle	4.6
hrBMP-7	11.1

7AAD: 7 Amino Actinomicina D; hrBMP-7: *human recombinant bone morphonegenetic* protein-7.

A viabilidade dos esferoides induzidos por TGF-β3 foi avaliada por kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD* devido a impossibilidade de dissociação enzimática e mecânica desses esferoides. Foi observada uma elevada marcação de células vivas (em verde) nos esferoides ao longo das semanas de cultivo, evidenciando a atividade de calceína citoplasmática (Fig. 12A, B e C). Foi possível notar células mortas (em vermelho), evidenciando a marcação de homodímero de etídio, somente na periferia dos esferoides, em duas semanas de cultivo (Fig. 12A).



Figura 12: Viabilidade celular por kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD* dos esferoides induzidos por TGF-β3 em duas, três e cinco semanas de cultivo. (A) Esferoide induzido em duas semanas de cultivo. Notar células mortas na periferia do esferoide (seta). (B) Esferoide induzido em três semanas de cultivo. (C) Esferoide induzido em cinco semanas de cultivo. (D) Controle de morte.

5.2.3 Diferenças na estrutura de superfície dos esferoides controles e induzidos

Com o intuito de avaliar a superfície dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 cultivados por 3 semanas, foram feitas análises por microscopia eletrônica de varredura.

Em relação a morfologia, foi possível observar uma diferença quanto ao formato celular e de interações entre as células, quando os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 foram comparados (Fig. 13). Os esferoides controles apresentaram uma superfície mais lisa e aparentemente, um menor diâmetro de filamentos de interação celular (Fig. 13A, B), ao contrário dos esferoides induzidos, os quais apresentaram uma morfologia de superfície mais rugosa e com menos filamentos de matriz extracelular (Fig. 13C, D).



Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7. (A) Esferoide controle. Notar as interações celulares no esferoide controle (seta) (B). Esferoide induzido por hrBMP-7, onde é possível visualizar que as células apresentaram um formato celular mais arredondado (seta) (C). Notar as interações celulares (asterisco) e o formato das células presentes na superfície do esferoide (cabeça de seta) (D).

5.2.4 Diferenças morfológicas entre os esferoides de ASCs controles e os induzidos por hrBMP-7 e por TGF-β3

Com o objetivo de analisar a morfologia dos esferoides fabricados da condição controle e de ambas as condições de indução, foi realizada inicialmente uma coloração com Hematoxilina e Eosina.

Foi possível verificar que houve uma diferença morfológica em relação aos esferoides controle e induzidos por hrBMP-7. As células dos esferoides controles apresentaram uma morfologia arredondada distribuindo-se de forma uniforme nos esferoides, com exceção da periferia, onde as células apresentaram uma morfologia mais fibroblastoide, verificada pelos núcleos mais fusiformes (Fig. 14A, B). Os esferoides induzidos por hrBMP-7 (Fig. 14C, D) apresentaram uma morfologia celular arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos, com a presença de agrupamentos celulares localizados lateralmente (seta) no interior dos esferoides. Além disso, no interior desses esferoides, houve a presença de células com uma morfologia necrótica (cruz), caracterizadas por núcleos aparentemente maiores e com uma alta intensidade de marcação de hematoxilina (Fig. 14C).



Figura 14: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 após 3 semanas de cultivo. (A, B) Esferoides controles. (C, D) Esferoides induzidos por hrBMP-7. Note uma região predominantemente eosinofílica e sem núcleos (seta). Barra de escala de 50µm.

Nos esferoides induzidos por TGF-β3, foi possível observar diferenças morfológicas ao longo das semanas de cultivo através da coloração por Hematoxilina e Eosina (Fig. 15).

Em duas semanas de cultivo, foi possível visualizar uma população de células com formato arredondado e com a presença de prolongamentos, localizada em um região preferencial central no interior dos esferoides. As células da periferia, apresentaram-se mais fibroblastoides, uma vez que os núcleos se mostraram mais fusiformes nesta área dos esferoides (Fig. 15A, B).

Ao final de três semanas de cultivo, a matriz extracelular dos esferoides apresentou diferença em relação a sua organização, contendo também uma maior quantidade de fibras. Foi possível observar as células deslocadas no interior dos esferoides, com formato arredondado em sua maioria, sem prolongamentos e com núcleos com uma marcação intensa para hematoxilina. As células na periferia apresentaram-se mais fibroblastoides (Fig. 15C, D).

Em cinco semanas, foi possível observar uma nova organização da matriz extracelular, com uma grande quantidade de fibras, principalmente em áreas próximas a periferia dos esferoides, com uma baixa quantidade de células nesta região (Fig. 15E, F). Além disso, houve a presença de uma população morfologicamente distinta localizada em um região preferencial central (Fig. 15E, F). Nesta área, as células apresentaram uma morfologia arredonda com prolongamentos e os núcleos com uma coloração mais intensa para hematoxilina (Fig. 15E, F). No interior da população deslocada lateralmente nos esferoides, houve a presença de uma célula poli nuclear (Fig. 15F).



Figura 15: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos esferoides induzidos por TGF-□3 após duas, três e cinco semanas de cultivo. Esferoides cultivados durante duas semanas. Note a presença de uma população celular deslocada no interior dos esferoides (seta) e de células na periferia com uma morfologia fibroblastoide (cabeça de seta) (A, B). Esferoides cultivados durante três semanas. Note uma reorganização da matriz extracelular na periferia dos esferoides (cruz) e o deslocamento da população celular no interior dos esferoides (seta) (C, D). Esferoides cultivados por cinco semanas. Note uma nova reorganização da matriz extracelular na periferia dos esferoides (cruz) e o deslocamento da população celular no interior dos esferoides (seta) (C, D). Esferoides cultivados por cinco semanas. Note uma nova reorganização da matriz extracelular na periferia dos esferoides, com uma maior quantidade de fibras (cruz) e na população de células deslocada lateralmente (seta), a presença de uma célula poli nuclear (asterisco) (E, F).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs

5.3.1 Expressão de genes relacionados à via de diferenciação osteogênica em esferoides de ASCs induzidos por hrBMP-7

A fim de analisar se os esferoides induzidos por hrBMP-7, cultivados durante 3 semanas estariam expressando genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica, foram realizados ensaios de Q-PCR utilizando sondas para Runx2, Colágeno I e fosfatase alcalina (ALP, Alkaline Phosphatase). Além disso, foi utilizada a sonda de Sox-9, correspondente ao gene máster do processo de condrogênese para analisar se os esferoides fabricados estariam seguindo esta via de diferenciação. Em adição, a expressão gênica de TSP-1 foi analisada, por ser uma proteína anti-angiogênica e anti-hipertrófica.

Foi possível verificar que os esferoides induzidos por hrBMP-7, quando comparados aos esferoides controles, apresentaram a mesma expressão gênica de RUNX2 (Fig. 16A, p = 0,391527) e uma expressão oito vezes maior de fosfatase alcalina (Fig. 16B, p = 0,00159727). Além disso, não houve diferença de expressão de Sox9 (Fig. 16C, p = 0,963774), porém, esferoides induzidos apresentaram a metade da expressão gênica de TSP-1 (Fig. 16D, p = 0,000164047) e de Colágeno I (Fig. 16E, p = 0,00443644) em relação aos esferoides controles.


Figura 16: Expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica e condrogênica por Q-PCR em esferoides controles e induzidos por hrBMP-7. Comparação relativa da expressão gênica de (A) RUNX2, (B) ALP, (C) Sox9, (D) TSP-1 e (G) Colágeno I por esferóides induzidos por hrBMP-7 em comparação aos esferóides da condição controle. As linhas contínuas indicam análises de teste t múltiplo, o qual foi empregado a fim de analisar a diferença estatística entre os esferoides controles e induzidos por hrBMP-7. Os asteriscos indicam valores de *p* obtidos no teste t (* p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0005; *** p<0,0001).

5.3.2 Maior presença de depósitos de cálcio em esferoides de ASCs induzidos por TGF-β3 em relação aos esferoides induzidos por hrBMP-7

Com o intuito de verificar a presença de depósitos de cálcio, um indício do processo de mineralização óssea, foi realizada a coloração por Alizarina vermelha nos esferoides controles e induzidos de ambas as condições de indução (hrBMP-7 e TGF-β3).

É possível observar o resultado da coloração por Alizarina nos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 cultivados por 3 semanas na figura 17. Os

esferoides controles (Fig. 17A, B) não apresentaram depósitos de cálcio elevados, estando restritos a algumas regiões da periferia dos esferoides (seta). Por outro lado, os esferoides induzidos (Fig. 17C, D) apresentaram regiões com a presença de depósitos de cálcio, preferencialmente em uma população celular localizada lateralmente nestes esferoides (cabeça de seta).



Figura 17: Coloração por Alizarina vermelha dos esferoides induzidos por hrBMP-7 após 3 semanas de cultivo. (A, B) Esferoides controles. Note a presença de marcação de alizarina somente na periferia dos esferoides (seta) (A). Esferoides induzidos por hrBMP-7, com a presença de depósitos de fosfato de cálcio (cabeça de seta) (C, D). Barra de escala de 50µm.

A figura 18 mostra o resultado da coloração de Alizarina vermelha para os esferoides induzidos por TGF-β3 ao final de três e cinco semanas de cultivo. Houve a presença de depósitos de cálcio na população de células deslocada no interior dos esferoides induzidos (Fig. 18A). Em um maior aumento, é possível notar de forma mais proeminente a coloração de alizarina vermelha nesta região (Fig. 18B). Nos esferoides cultivados por cinco semanas, é possível observar uma elevada quantidade de depósitos de cálcio (Fig. 18C, D), devido à maior intensidade de marcação para Alizarina.



Figura 18: Coloração de Alizarina vermelha dos esferoides induzidos por TGF-β3 após duas, três e cinco semanas de cultivo. (A) Esferoides induzidos cultivados por três semanas. (B) Ampliação digital da área demarcada em (A). Notar os depósitos de cálcio (seta). (C) Esferoides induzidos cultivados por cinco semanas. (D) Ampliação digital da área demarcada em (C). Notar a presença de uma maior quantidade de depósitos de cálcio (seta). Barra de escala de 50μm.

5.3.3 Diferenças no conteúdo elementar dos esferoides de ASCs controles e induzidos para a via osteogênica

Com o intuito de verificar a presença do átomo de cálcio, por quantificação relativa, nos esferoides induzidos, por representar um indício do processo de diferenciação osteogênica, foram realizadas análises por microanálise de raio-X (EDX) na superfície dos esferoides analisados no microscópio eletrônico de varredura.

Através da análise elementar e do mapeamento realizado, não foi possível visualizar a presença do átomo de cálcio na superfície dos esferoides controles (Fig. 19A, C), enquanto que nos esferoides induzidos por hrBMP-7 foi possível visualizar a presença desse átomo, em uma amplitude próxima a 40 cps/eV (Fig. 19B, D). Nos esferoides controles, foi observa a presença de carbono, oxigênio

e ósmio pelo mapeamento (Fig. 19A) e nos esferoides induzidos também foi observada a presença destes elementos citados, além do cálcio (Fig. 19B).



Figura 19: Análise elementar dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7. Ausência do elemento cálcio na superfície dos esferoides controles (A). Distribuição do elemento cálcio na superfície dos esferoides induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7 (B). Gráfico mostrando a presença de elementos na superfície dos esferoides controles, onde não foi detectado o elemento cálcio (C). Gráfico mostrando a distribuição de elementos na superfície dos esferoides induzidos por hrBMP-7, onde foi detectado o elemento cálcio (D).

Os esferoides induzidos por TGFβ-3 apresentaram um maior sinal para o elemento cálcio por EDX na quinta semana (80 cps/eV), quando comparado com a terceira (60 cps/eV) e segunda semana (40 cps/eV), respectivamente, como é possível visualizar na figura 20.



Figura. 20: Análise do elemento cálcio na superfície dos esferoides induzidos por TGFβ-3 ao longo de duas, três e cinco semanas de cultivo.

5.3.4 Análise de moléculas de matriz extracelular nos esferoides

Com o objetivo de avaliar a presença de moléculas de matriz extracelular nos esferoides induzidos de ambas as condições de indução, comparando com os controles, foram feitas análises de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos específicos para identificação de colágeno I (típico do tecido ósseo), colágenos II e VI (característicos do tecido cartilaginoso), colágeno X (secretado por condrócitos hipertróficos em eventos de ossificação endocondral), agrecana (típica da matriz extracelular da cartilagem), osteopontina, osteocalcina, biglicana, tenascina C (típicas do tecido ósseo) e TSP-1 (uma proteína antiangiogênica e anti-hipertrófica). Além disso, a fim de avaliar a adesão celular nos esferoides, foi realizada uma marcação para N-caderina (Fig. 21 e 24).

A N-caderina apresentou-se mais expressa nos esferoides da condição controle (Fig. 21A) quando comparado com a condição induzida por hrBMP-7 (Fig. 21B). Nos esferoides da condição controle, a distribuição de N-Caderina foi preferencialmente em áreas próximas à periferia dos esferoides.

Em relação ao colágeno I, foi possível observar uma maior marcação no interior dos esferoides induzidos por hrBMP-7 (Fig. 21D), enquanto que nos esferoides controles, foi verificada uma marcação somente em áreas próximas à periferia (Fig. 21C).

Não houve marcação de colágeno II, característico do tecido cartilaginoso, nos esferoides controles (Fig. 21E), porém houve uma elevada distribuição desta molécula no interior dos esferoides induzidos por hrBMP-7 preferencialmente no centro dos esferoides (Fig. 21F).

Tanto os esferoides controles (Fig. 21G) como induzidos por hrBMP-7 (Fig. 21H) apresentaram uma elevada marcação para colágeno X. No entanto, os esferoides induzidos apresentaram uma marcação mais intensa e distribuída de forma homogênea em seu interior. Os esferoides controles, apresentaram uma marcação preferencialmente em regiões próximas à periferia.

Não houve marcação para osteopontina e osteocalcina nos esferoides controles (Fig. 22A, C). Apesar de os esferoides induzidos por hrBMP-7 não apresentarem expressão de osteopontina (Fig. 22B), houve uma expressão, ainda que baixa, de osteocalcina (Fig. 22D) localizada preferencialmente na região próxima à periferia destes esferoides

Em relação à biglicana, os esferoides controles apresentaram áreas com marcação em regiões próximas a periferia (Fig. 22E), enquanto que não houve detecção de biglicana nos esferoides induzidos por hrBMP-7 (Fig. 22F).

Houve áreas com baixa marcação de tenascina C próximas à periferia dos esferoides controles (Fig. 22G), porém, uma marcação expressiva foi observada nos esferoides induzidos em uma população celular deslocada lateralmente no interior esferoides (Fig. 22H).



Figura 21: Composição de N-caderina, colágeno I, colágeno II e colágeno X em esferoides controles e induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7. A expressão de N-caderina (A, B) e colágenos I (C, D), II (E, F) e X (G, H) foram avaliados nos esferoides controles (A, C, E, G) e induzidos por hrBMP-7 (B, D, F, H). Barra de escala de 50µm.



Figura 22: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides controles e induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7. A expressão de osteopontina (A, B), osteocalcina (C, D), biglicana (E, F) e tenascina C (G, H) foram avaliados nos esferoides controles (A, C, E, G) e induzidos por hrBMP-7 (B, D, F, H). Barra de escala de 50µm.

Esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram diferenças em relação à marcação para as moléculas de matriz extracelular ao longo das semanas de cultivo avaliadas e em relação à indução por hrBMP-7 (Figs. 23, 24, 25, 26, 27 e 28).

Após duas semanas de indução com TGF-β3 não foi possível observar a presença de colágeno II em nenhuma região dos esferoides (Fig. 23A, B). No entanto, foi possível observar distribuição de colágeno VI em áreas da periferia e uma maior distribuição na região central dos esferoides (Fig. 23C, D). Foi observada uma elevada distribuição de colágeno X em toda a área dos esferoides (Fig. 23E, F), ao contrário do que foi observado para TSP-1, cuja presença foi baixa (Fig. 23G, H). Não houve marcação de agrecana (Fig. 24A, B) e N-caderina (Fig. 24C, D), após duas semanas de indução por TGFβ-3.

Ao final de três semanas de indução, os esferoides induzidos com TGFβ3 não apresentaram colágeno I (Fig. 25A, B) e houve uma redução da distribuição de colágeno X em toda a área dos esferoides (Fig. 25C, D) quando comparado com duas semanas. Houve marcação de N-caderina somente em áreas da periferia dos esferoides (Fig. 25E, F) uma elevada distribuição de TSP-1 (Fig. 25G, H).

Em relação às proteínas tipicamente presentes na matriz extracelular do tecido ósseo, em três semanas de indução, não houve a presença de osteopontina (Fig. 26A, B), porém houve a distribuição de osteocalcina na população de células deslocada na região central dos esferoides e em algumas regiões próximas à periferia (Fig. 26C, D). Foi observada marcação para biglicana em regiões próximas à periferia dos esferoides (Fig. 26E, F), enquanto que não foi possível visualizar marcação para tenascina C (Fig. 26G, H).

Após cinco semanas de indução, foi observada uma ampla distribuição de colágeno I em toda a área dos esferoides (Fig. 27A, B), além de uma intensa marcação de colágeno X, principalmente na região central dos esferoides (Fig. 27C, D). No caso da N-caderina, houve uma baixa distribuição somente em regiões próximas à periferia dos esferoides (Fig. 27E, F) e foi observada uma redução na marcação da proteína TSP-1 em relação a duas semanas (Fig. 27 G, H).

Com relação às outras proteínas presentes na matriz extracelular do tecido ósseo, após cinco semanas de indução, foi observada distribuição de osteopontina na população de células descolada lateralmente e próximo à periferia dos esferoides (Fig. 28A, B). No entanto, houve uma maior distribuição de osteocalcina, a qual estava distribuída em toda a área dos esferoides (Fig. 28 B, C), assim como a biglicana (Fig. 28D, E). Também houve uma alta marcação de tenascina C na população de células deslocada no interior dos esferoides e próximo à periferia, porém em menor intensidade (Fig. 28F, G).



Figura 23: Composição de colágeno II, colágeno VI, colágeno X e TSP-1 em esferoides induzidos por TGF-β3 cultivados durante duas semanas. (A) Esferoides marcados para colágeno II. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para colágeno VI. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides marcados para colágeno X. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para colágeno X. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para colágeno X. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (F). (G) Esferoides marcados para TSP-1. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (H). Barra de escala de 50µm. (B), (D), (F) e (H) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C), (E) e (G) respectivamente.



Figura 24: Composição de agrecana e N-caderina em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF- β 3 cultivados durante duas semanas, além do controle da reação. (A) Esferoides marcados para agrecana. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para N-caderina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides com ausência de marcação (E). Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em uma região no interior dos esferoides (F). Barra de escala de 50µm. (B), (D) e (F) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C) e (E) respectivamente.



Figura 25: Composição de colágeno I, colágeno X, N-caderina e TSP-1 em esferoides induzidos por TGF- β 3 cultivados durante duas semanas. (A) Esferoides marcados para colágeno I. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para colágeno X. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides marcados para N-caderina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (E) uma região no interior dos esferoides (F). (G) Esferoides marcados para TSP-1. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (G) uma região no interior dos esferoides (H). Barra de escala de 50µm. (B), (D), (F) e (H) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C), (E) e (G) respectivamente.



Figura 26: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF- β 3 cultivados durante três semanas. (A) Esferoides marcados para osteopontina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para osteocalcina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para biglicana. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para biglicana. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (F). (G) Esferoides marcados para tenascina C. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (H). Barra de escala de 50µm. (B), (D), (F) e (H) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C), (E) e (G) respectivamente.



Figura 27: Composição de colágeno I, colágeno X, N-caderina e TSP-1 em esferoides induzidos por TGF-β3 cultivados durante cinco semanas. (A) Esferoides marcados para colágeno I. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para colágeno X. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides marcados para N-caderina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (E) uma região no interior dos esferoides (F). (G) Esferoides marcados para TSP-1. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (G) uma região no interior dos esferoides (H). Barra de escala de 50μm. (B), (D), (F) e (H) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C), (E) e (G) respectivamente.



Figura 28: Composição de osteopontina, osteocalcina, biglicana e tenascina C em esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF- β 3 cultivados durante cinco semanas. (A) Esferoides marcados para osteopontina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (A) uma região no interior dos esferoides (B). (C) Esferoides marcados para osteocalcina. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para biglicana. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (D). (E) Esferoides marcados para biglicana. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (F). (G) Esferoides marcados para tenascina C. Note pelo zoom digital a partir da área demarcada em (C) uma região no interior dos esferoides (H). Barra de escala de 50µm. (B), (D), (F) e (H) são imagens obtidas por zoom digital das micrografias (A), (C), (E) e (G) respectivamente.

5.3.5 Baixa secreção de mediadores solúveis por esferoides de ASCs induzidos por hrBMP-7

A secreção de VEGF (fator secretado em eventos de ossificação), RANTES (quimiocina expressa em eventos de diferenciação osteogênica) e IL-6 (citocina que estimula a diferenciação osteoblástica) pelos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 cultivados durante 3 semanas foi avaliada. Os esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram uma baixa secreção de IL-6 (Fig. 29A), VEGF (Fig. 29B) e RANTES (Fig. 29C), todos em torno de 20pg/mL, quando comparado com os esferoides da condição controle, aproximadamente 200pg/mL, ao final do período de cultivo.



Figura 29: Quantificação de mediadores solúveis secretados por esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 após 3 semanas de cultivo. Quantificação da secreção de (A) IL-6, (B) VEGF e (C) RANTES em esferoides controles e induzidos por hrBMP-7.

5.3.6 Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7 apresentam uma baixa resistência à compressão mecânica, ao contrário de esferoides induzidos por TGF-β3

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade dos esferoides biofabricados, controles e induzidos de ambas as condições, foram realizadas análises de resistência à compressão mecânica (Fig. 30).



Figura 30: Sequência de eventos durante um ciclo completo de compressão de um esferoide no equipamento Microsquisher (Cell Scale). (A) Esferoide posicionado entre as duas placas do equipamento antes da compressão ser iniciada. (B, C) Esferoide sendo comprimido até 25% do seu diâmetro. (D) Esferoide ao final do processo de compressão.

Foi possível observar que os esferoides induzidos para a via osteogênica por hrBMP-7, apresentaram uma menor resistência mecânica, com valor de média de 20 μ N, quando comparados aos controles, que apresentaram uma média do valor de força de 40 μ N (Fig. 31)



Figura 31: Resistência à compressão mecânica dos esferoides de ASCs controles e induzidos por hrBMP-7.

Já esferoides induzidos por TGF- β 3 apresentaram elevada resistência mecânica à compressão ao longo das semanas quando comparado com os esferoides da condição controle (Fig. 32). Em duas semanas de cultivo, os esferoides induzidos apresentaram uma média de resistência à compressão de 451µN, enquanto que os esferoides controles apresentaram uma média de 62µN (p < 0,0001). Em três semanas de indução, a média da força de resistência mecânica dos esferoides induzidos apresentou uma redução para 403µN, assim como a média da força de resistência dos esferoides controles para 52µN (p < 0,0001). Em cinco semanas de indução, houve uma redução da força de resistência à compressão nos esferoides induzidos para uma média de 226µN, assim como nos esferoides controles, para uma média de 40µN (p < 0,0001).

Além disso, os esferoides da condição induzida apresentaram uma diferença significativa da força de resistência entre duas e cinco semanas de cultivo e entre três e cinco semanas de cultivo (p < 0,0001 e p = < 0,0001, respectivamente).



Figura 32: Resistência mecânica dos esferoides de ASCs controles e induzidos por TGF- β 3 em duas, três e cinco semanas de cultivo. Os resultados apresentados de cada condição ao longo das semanas de cultivo foram obtidos a partir de quatro esferoides. Os asteriscos indicam valores de *p* obtidos por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* *p*<0,05; ** *p*<0,001; *** *p*<0,0005; **** *p*<0,0001).

A fim de visualizar melhor os resultados obtidos da condição controle e induzida por ambas as condições, foi feito um quadro com um sistema de cruzes para avaliar os marcadores de matriz extracelular, fatores de transcrição gênica relacionados a via de diferenciação osteogênica, mediadores solúveis, força de resistência mecânica à compressão e coloração de alizarina vermelha (quadro 1). A comparação foi feita entre as condições controle e induzidas em relação à presença de marcação para cada molécula de matriz extracelular, expressão de cada gene e componente secretado avaliado. No caso da indução por TGF-β3, a comparação também foi feita entre as semanas de cultivo analisadas.

Quadro 1: Resumo dos resultados quando comparados entre as condições controle e induzidas para a via osteogênica por hrBMP-7 e por TGF-β3 ao longo das semanas de cultivo.

² sem: 2 semanas; 3 sem: 3 semanas; 5 sem: 5 semanas. NA: não avaliado.

Quadro 1.

Г

	Condição controle	hrBMP-7	TGF-β3 2 sem	TGF-β3 3 sem	TGF-β3 5 sem
Coloração de Alizarina vermelha	+	++	NA	++	++++
Moléculas de matriz extracelular	Condição controle	hrBMP-7	TGF-β3 2 sem	TGF-β3 3 sem	TGF-β3 5 sem
Colágeno I	+	++	NA	+	+++++
Colágeno II	-	+++	-	NA	NA
Colágeno VI	NA	NA	++	NA	NA
Colágeno X	++	++	+++++	+++	++++
Agrecana	NA	NA	+	NA	NA
N-Caderina	++	+	+	+	++
Osteopontina	+	+	NA	+	++
Osteocalcina	+	++	NA	+	++++
Biglicana	++	+	NA	+	++++
Tenascina C	+	++	+	+	+++
TSP-1	NA	NA	+	+++	+

Fatores de transcrição gênica	Condição controle	hrBMP-7	TGF-β3 2 sem	TGF-β3 3 sem	TGF-β3 5 sem
Colágeno I	++	+	NA	NA	NA
Runx2	+	+	NA	NA	NA
ALPL	+	++++	NA	NA	NA
Sox9	+	+	NA	NA	NA
TSP-1	++	+	NA	NA	NA
Mediadores solúveis	Condição controle	hrBMP-7	TGF-β3 2 sem	TGF-β3 3 sem	TGF-β3 5 sem
IL-6	+++	+	NA	NA	NA
VEGF	+++	+	NA	NA	NA
RANTES	+++	+	NA	NA	NA
Resistência mecânica	Condição controle	hrBMP-7	TGF-β3 2 sem	TGF-β3 3 sem	TGF-β3 5 sem
	+	-	+++++	++++	+++

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi possível realizar a comparação da eficácia do processo de diferenciação osteogênica *in vitro* em esferoides de células-tronco de tecido adiposo humano a partir de dois protocolos diferentes de indução. A osteogênese é um processo complexo mediado por diferentes fatores de transcrição gênica (VALENTI *et al.*, 2016). Durante a osteogênese, diferentes mudanças morfológicas ocorrem no tecido, de modo que há reorganização das células e das moléculas de matriz extracelular (VALENTI *et al.*, 2016). Além disso, células-tronco ou precursoras de osteoblastos iniciam um processo complexo de diferenciação, modificando sua arquitetura a partir de uma morfologia fibroblastoide para uma forma cuboide e começam a produzir uma matriz extracelular semelhante à do tecido ósseo (LANGENBACH *et al.*, 2012).

Diferentes estudos *in vitro* utilizando cultivos 2D de células (monocamada) já foram realizados na tentativa de recapitular os eventos de diferenciação osteogênica (SHEKARAN *et al.*, 2015, BÖHRNSEN *et al.*, 2016, CHAN *et al.*, 2015). No entanto, em cultivos 2D, as células interagem somente com as células vizinhas e possuem um contato limitado com proteínas de matriz extracelular, não mimetizando da forma ideal os processos que ocorrem *in vivo* (BAPTISTA, KRONEMBERGER *et al.*, 2018). Em cultivos 3D, há uma amplificação das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, o que resulta em mudanças nas respostas celulares e inclusive de transcrição gênica (ABBOT, 2003).

Em cultivos 3D em frascos giratórios (FRITH *et al.*, 2010), superfícies carregadas (GURUMURTHY *et al.*, 2017), suspensão (VIDYASEKAR *et al.*, 2016) e superfícies não aderentes (YAMAGUCHI *et al.*, 2014) já foi relatado ocorrer uma aceleração do processo de osteogênese, de modo que há a formação de nódulos de mineralização em até três dias de cultivo (SALASZNYK *et al.*, 2004), ao contrário de cultivos em monocamada os quais podem começar a ser formados somente após uma semana (LANGENBACH *et al.*, 2010).

Até o momento, poucos estudos foram realizados com esferoides para um modelo de diferenciação osteogênica utilizando MSCs e ASCs. As principais vantagens em se utilizar esferoides de MSCs e de ASCs são que estes apresentam um aumento de propriedades pró-angiogênicas, anti-inflamatórias, imuno-modulatórias e de sobrevivência (PETRENKO *et al.*, 2017).

Os esferoides podem ser fabricados por diferentes técnicas de cultivo 3D, como por gota pendente, micro fluídica e por centrifugação, cada uma com vantagens e desvantagens (BAPTISTA, KRONEMBERGER *et al.*, 2018). No entanto, a técnica de cultivo que reúne o maior número de vantagens é a de hidrogel de agarose micromoldado (ACHILLI *et al.*, 2012), utilizada neste trabalho. Esta técnica torna possível fabricar um elevado número de esferoides com tamanho e forma homogêneos, acompanhar o processo de formação dos esferoides (ACHILLI *et al.*, 2012), além de ser passível de automatização (MIRONOV *et al.*, 2011).

Para modelos de diferenciação osteogênica, os fatores de indução comumente utilizados são dexametasona, ácido ascórbico e β-glicerofosfato (LANGENBACH *et al.*, 2012). Além destes, fatores de crescimento podem ser incorporados no cultivo para atuar positivamente no processo de diferenciação osteogênica, como por exemplo, vitamina D3, BMPs e monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*) (LANGENBACH *et al.*, 2012).

Dentre as BMPs recombinantes, as mais utilizadas para regeneração óssea são a human recombinant BMP-2 (hrBMP-2) e a human recombinant BMP-7 (hrBMP-7) (CIRANO et al., 2014, KIM E RHEE, 2014). A hrBMP-2 é determinante para a proliferação e diferenciação de osteoblastos (VAN DEN DOLDER et al., 2003), enquanto que a hrBMP-7 estimula o metabolismo ósseo, além de modular a proliferação e diferenciação de MSCs em células do tecido ósseo (AÇIL et al., 2002). Para estudos realizados em monocamada (WEI et al., 2008), com biomateriais (CHATZINIKOLAIDOU et al., 2010, TIRKKONEN et al., 2013) e em modelos animais (INTINI et al., 2007, CHEN et al., 2015), ambas já foram utilizadas e resultados positivos para regeneração óssea foram demonstrados. No entanto, nenhuma destas foi utilizada até o momento em cultivos 3D para avaliar a diferenciação osteogênica in vitro. Neste trabalho, foi utilizada a hrBMP-7 como fator de indução em esferoides de ASCs, combinada com o uso de dexametasona e β-glicerofosfato ao longo de três semanas de cultivo, como uma das estratégias testadas de indução de diferenciação osteogênica.

Uma outra estratégia descrita por Muraglia e colaboradores (2003) para promover a diferenciação osteogênica *in vitro* utilizando esferoides é a partir de

um coquetel indutor composto inicialmente por fatores de indução condrogênica e somente após um período em cultura, utilizar fatores de indução osteogênica, de modo a alcançar a diferenciação osteogênica por um processo similar ao de ossificação endocondral. No estudo, foram produzidos cultivos 3D de MSCs humanas derivadas da medula óssea pelo cultivo de pellet. O meio indutor da condrogênese foi composto por hrTGF- β 1 e dexametasona, no qual os esferoides permaneceram por até quatro semanas. Ao final deste período, houve a troca para os fatores de indução osteogênica β-glicerofosfato e dexametasona em uma maior concentração, e os esferoides permaneceram neste meio indutor por mais três semanas em cultivo. Dessa maneira, no presente trabalho, foi testada uma segunda estratégia de indução da diferenciação osteogênica, de modo similar à realizada por Muraglia e colaboradores (2003), uma vez que foi utilizado inicialmente os fatores de diferenciação condrogênica TGF-β3 e dexametasona por duas semanas (DA SILVA, 2017 e MATSUI, 2017) e posterior troca para os fatores β-glicerofosfato e dexametasona em uma maior concentração por mais três semanas.

Inicialmente, foram avaliados o tamanho dos esferoides pelo cálculo das médias dos diâmetros e a homogeneidade de tamanho pelo cálculo da razão entre o diâmetro menor e maior da condição controle (que não apresentou nenhum fator de indução) e dos esferoides induzidos por hrBMP-7 ou por TGFβ3. Os esferoides controles apresentaram uma média de diâmetro de 350µM, ao passo que que os esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram uma média de 400µM e os esferoides induzidos por TGF-β3 de 450µM. Nas três condições experimentais, a razão entre os diâmetros foi próxima a 1, porém, os esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram maior uniformidade de tamanho e forma.

Esferoides de MSCs ou ASCs com um valor de diâmetro entre 400-500µM normalmente não apresentam alterações na viabilidade celular por necrose (KAPUR *et al.*, 2012, BARANIAK E MCDEVITT, 2012). Tais esferoides podem apresentar uma redução dos seus valores de diâmetro ao longo das semanas de cultivo, provavelmente devido ao equilíbrio alcançado entre o tamanho de crescimento dos esferoides e a habilidade do meio de cultura suportar o aumento de diâmetro (KAPUR *et al.*, 2012). Em adição, no estudo realizado por Hildebrandt e colaboradores (2011), o diâmetro de esferoides de MSCs induzidos para a via osteogênica foi de 350-400µM ao final do período de

indução. Além disso, já foi reportado que nesta faixa de tamanho, a viabilidade dos esferoides não é afetada por eventos de necrose celular (ANADA *et al.*, 2012). Neste contexto, no presente estudo, foi observado por citometria de fluxo em esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, utilizando o intercalante de DNA 7AAD, uma viabilidade celular superior a 85% para ambas condições de cultivo. No entanto, esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram uma maior mortalidade do que os esferoides controles. Por kit comercial de fluorescência, também foi observada uma elevada viabilidade celular nos esferoides induzidos por TGF-β3 ao longo das semanas de cultivo, visto que houve uma baixa marcação do homodímero de etídio, presente somente em células mortas. No estudo realizado por Hildebrandt e colaboradores (2011), esferoides de MSCs produzidos pelo método de gota pendente foram induzidos para a diferenciação osteogênica e quando a viabilidade celular foi avaliada qualitativamente por microscopia de fluorescência, a mesma se manteve elevada mesmo após 29 dias em cultivo.

Através dos resultados da coloração de HE, foi possível observar que a morfologia das células da condição controle, induzida por hrBMP-7 e por TGFβ3 são distintas. Os esferoides da condição induzida por hrBMP-7, ao contrário da condição controle, apresentaram uma subpopulação de células deslocada lateralmente em seu interior. Os esferoides induzidos por TGF-\u00b33 apresentaram uma população de células deslocada lateralmente, além de modificações na estrutura e organização da matriz extracelular ao longo das semanas de cultivo avaliadas. Durante o processo de osteogênese in vivo, ocorrem eventos de agregação celular, gerando subpopulações de células que apresentam uma maior capacidade de proliferação e atividade de secreção de moléculas de matriz extracelular, as quais tornam-se responsáveis por orquestrar os eventos de diferenciação (HALL E MIYAKE, 2000, HATA et al., 2017). A presença de subpopulações de células também foi relatada em esferoides produzidos a partir de MSCs isoladas da medula óssea para gerar um modelo de diferenciação osteogênica (MARKWAY et al., 2010; LANGENBACH et al., 2013; GOUDE et al., 2014).

Por MEV, foi possível analisar a ultraestrutura da superfície dos esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, onde foi visualizado que os esferoides controles apresentaram uma superfície com uma maior quantidade de fibras de

matriz extracelular em sua superfície, quando comparado com os esferoides induzidos por hrBMP-7. Por outro lado, os esferoides induzidos por hrBMP-7 apresentaram células com uma morfologia globular em sua superfície. No entanto, esta morfologia não foi a mesma que a encontrada por Lammers e colaboradores (2012) com esferoides de células-tronco de cordão umbilical induzidos para via osteogênica, onde a superfície dos esferoides induzidos apresentou-se cuboide, semelhante a osteoblastos e com indícios de mineralização. As análises para avaliar a ultraestrutura dos esferoides induzidos por TGF-β3 por MEV estão em etapa de realização.

A capacidade de secreção de mediadores solúveis por esferoides de MSCs e ASCs já foi relatada em diferentes estudos (POTAPOVA *et al.*, 2007, OLIVA-OLIVERA *et al.*, 2017, GE *et al.*, 2018, REDONDO-CASTRO *et al.*, 2018). A secreção de determinados mediadores solúveis é uma maneira de avaliar a eficácia de diferenciação dos esferoides e sua resposta funcional ao microambiente. Neste trabalho, foi analisada a secreção de IL-6, VEGF e RANTES em esferoides controles e induzidos por hrBMP-7 cultivados durante 21 dias. As análises de secreção destes mediadores solúveis nos esferoides induzidos por TGF-β3 estão em etapa de realização.

A IL-6 é uma citocina que, dentre outras funções, estimula a diferenciação osteoblástica e influencia positivamente na formação óssea em MSCs isoladas da medula óssea (BASTIDAS-CORAL *et al.*, 2016 e HUANG *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi observada uma baixa secreção de IL-6 nos esferoides induzidos por hrBMP-7, sendo 10 vezes menor do que o secretado por esferoides controles.

O VEGF é um dos reguladores principais do desenvolvimento vascular e angiogênese (HOEBEN *et al.*, 2004) e uma vez que o tecido ósseo é altamente vascularizado, o VEGF realiza funções críticas na formação do esqueleto (MAES *et al*, 2016). Além disso, o VEGF já foi reportado como um fator importante em diferentes estágios no reparo e regeneração óssea (HU E OLSEN, 2016). Estudos também já reportaram a influência de VEGF na produção de fosfatase alcalina e osteocalcina (HU E OLSEN, 2016). Neste trabalho, não houve uma alta secreção de VEGF por esferoides induzidos por hrBMP-7, sendo 10 vezes menor do que os esferoides controles.

A RANTES ou CCL5 (motivo C-C ligante 5) é uma quimiocina próinflamatória conhecida por atuar na migração e sobrevivência de células-tronco

99

(LU *et al.*, 2015). Em relação ao tecido ósseo, sua expressão mostrou-se elevada durante a diferenciação osteogênica de MSCs isoladas da medula óssea cultivadas em monocamada, de forma dependente da dexametasona (LIU *et al.*, 2014). Além disso, a alta expressão de RANTES aumentou a atividade de fosfatase alcalina nestas células (LIU *et al.*, 2014). Em adição, no estudo realizado por Wintges e colaboradores (2013), a falta de RANTES em camundongos foi prejudicial para a formação óssea por um aumento da atividade osteoclástica. Neste estudo, houve uma baixa secreção de RANTES por esferoides induzidos por hrBMP-7, que foi 10x menor.

Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa nestes dados de secreção de mediadores solúveis entre induzido por hrBMP-7 e controles, a diferença de secreção em até 10 vezes sugere uma forte tendência à baixa secreção pelos esferoides induzidos por hrBMP-7.

A porção mineral do tecido ósseo é similar à estrutura da hidroxiapatita (Ca10(PO₄)6(OH)2), composta por fosfato de cálcio, e ocorre no osteoide (BONJOUR, 2011). O processo de mineralização tem início por vesículas extracelulares secretadas por osteoblastos, que induzem no seu interior a nucleação e crescimento de cristais de fosfato de cálcio. O influxo de fosfato nas vesículas é crítico, sendo mediado por diferentes enzimas, sendo a fosfatase alcalina uma das principais por mediar a hidrólise do piro fosfato em íons fosfato (HASEGAWA, 2018). A fosfatase alcalina é secretada por osteoblastos em estágios iniciais de sua maturação (HOEMANN *et al.*, 2009). Neste trabalho, foi observada uma elevada expressão de fosfatase alcalina nos esferoides induzidos por hrBMP-7 em relação aos esferoides controles. Este resultado corroborou com o encontrado no estudo de Fennema e colaboradores (2017), no qual houve uma alta regulação de fosfatase alcalina em esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica, produzidos a partir da técnica de hidrogel de agarose micromoldado, quando comparado com a condição controle.

Uma forma de avaliar um indício de mineralização *in vitro* é através da coloração de Alizarina vermelha, a qual irá revelar a presença do cálcio extracelular. Pelos resultados encontrados neste trabalho, não foi possível visualizar a presença de depósitos de cálcio nos esferoides da condição controle, enquanto que nos esferoides induzidos por hrBMP-7, foi possível detectar depósitos na população de células deslocada lateralmente. Em adição, nos

esferoides induzidos por TGF- β 3, foi observado a presença de depósitos, evidenciada por uma maior coloração de Alizarina vermelha, em cinco semanas de cultivo, do que nos esferoides induzidos por hrBMP-7 em três semanas. No trabalho realizado por Shen e colaboradores (2013), esferoides de ASCs produzidos pelo método de gota pendente foram induzidos para a via osteogênica utilizando um coquetel feito a partir de vitamina D3, ácido ascórbico, dexametasona e β-glicerofosfato. Pela coloração por Alizarina vermelha, os autores identificaram a presença de depósitos de cálcio somente nos esferoides induzidos, preferencialmente localizados lateralmente no interior dos esferoides. Além disso, Gurumurthy e colaboradores (2016) observaram por coloração de Alizarina vermelha que esferoides de ASCs, produzidos a partir de superfícies carregadas, apresentam uma maior quantidade de depósitos de cálcio do que as células cultivadas em monocamada, concluindo que uma vez em cultivo 3D, as ASCs apresentam uma maior capacidade de mineralização. Os autores utilizaram no estudo um coquetel indutor feito a partir de ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerofosfato, suplementado com 10% SFB.

Uma outra técnica utilizada neste trabalho para avaliar a presença de mineralização nos esferoides induzidos por hrBMP-7 e por TGF- β 3, foi a realização de microanálises por EDX para detectar a presença de cálcio e/ou fósforo na superfície dos esferoides. Nos esferoides induzidos por hrBMP-7, foi identificada a presença de cálcio e fósforo, diferente dos esferoides da condição controle. Nos esferoides induzidos por TGF- β 3, foi observado que há um aumento do sinal de detecção de cálcio ao longo das semanas de indução.

As propriedades químicas e estruturais da porção mineral influenciam diretamente as propriedades mecânicas da matriz extracelular do tecido ósseo, de modo que uma elevada força de compressão é alcançada pelo avanço do grau de mineralização (BALA E SEEMAN, 2015). Neste trabalho, foram realizadas análises de resistência mecânica à compressão nos esferoides controles, induzidos por hrBMP-7 e por TGF-β3. Pelos resultados encontrados neste estudo, foi observado que houve uma baixa resistência mecânica à compressão nos esferoides induzidos por hrBMP-7 quando comparado aos controles. Uma explicação para tal resultados é, provavelmente, devido a um menor grau de complexidade de mineralização presente na matriz extracelular destes esferoides. Ao contrário, nos esferoides induzidos por TGF-β3, em duas

semanas, foi observada uma alta resistência mecânica à compressão com valores próximos a 400 μ N de força, o que se manteve em três semanas, com uma diferença estatística significativa em relação ao controle nestas semanas de cultivo avaliadas. Ao final de cinco semanas de indução, houve uma redução da força de resistência para 200 μ N. Porém, mesmo com esta redução em cinco semanas, o valor da força de resistência mecânica à compressão foi mais elevado do que os valores encontrados nos esferoides induzidos por hrBMP-7 e os da condição controle. Danilevicius e colaboradores (2015) foram os únicos autores até o momento a reportarem resistência mecânica à compressão em esferoides no Microsquisher (Cell Scale).

Dois genes principais orquestram o processo de osteogênese: o RUNX2 (ou Cbfa1) e o osterix. Na ausência destes fatores, não ocorre a formação dos osteoblastos, impedindo assim a formação do tecido ósseo (CAETANO-LOPES et al., 2007). O processo de diferenciação osteogênica é complexo, de modo que inicialmente ocorre a diferenciação de células progenitoras em pré-osteoblastos, que irão formar os osteoblastos maduros (XU *et al.*, 2015). Os osteoblastos secretam uma variedade de moléculas de matriz extracelular e quando embebidos na matriz extracelular mineralizada, tornam-se osteócitos maduros (XU *et al.*, 2015). Neste cenário, o RUNX2 apresenta atuação nas etapas iniciais da osteogênese, de modo que em etapas finais da diferenciação, ele é capaz de inibir o processo (XU *et al.*, 2015).

Durante o estágio inicial de diferenciação, o RUNX2 e o osterix estão envolvidos na expressão de colágeno I, osteopontina e osteocalcina. Para uma etapa mais tardia de maturação dos osteoblastos, a expressão de RUNX2 precisa ser menor. Além disso, em eventos de ossificação endocondral, o RUNX2 induz a expressão de colágeno X por condrócitos hipertróficos estando envolvido na produção de matriz destas células (BRUDERER *et al.*, 2014). Neste estudo, a expressão de RUNX2 foi investigada por Q-PCR nos esferoides induzidos por hrBMP-7 ao final dos 21 dias de cultivo. No entanto, foi observada a mesma expressão relativa que os esferoides da condição controle. De fato, no trabalho realizado por Yamaguchi e colaboradores (2014) com esferoides de MSCs murinos, produzidos a partir de superfícies não aderentes, houve uma alta expressão de RUNX2 quando comparado com o cultivo em monocamada, porém

a análise foi feita com os esferoides após 7 dias de indução, um período inicial da diferenciação osteogênica.

A expressão relativa de um dos genes reguladores do processo de diferenciação condrogênica, o Sox9 (KOZHEMYAKINA *et al.*, 2015), foi investigada por Q-PCR nos esferoides induzidos por hrBMP-7 cultivados durante 21 dias em relação aos esferoides controles. O Sox9 é um dos marcadores iniciais da condensação dos condrócitos, sendo considerado o principal fator de transcrição envolvido no desenvolvimento e maturação da cartilagem (LI E DONG, 2016). Além disso, estudos já relataram a expressão de Sox9 em etapas iniciais da osteogênese (LOEBEL *et al.*, 2014) e como um potencial inibidor deste processo (LIAO *et al.*, 2014). Neste trabalho, não houve diferença significativa de expressão do Sox9 entre esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, o que mostra que estes esferoides não estariam seguindo para essa via de diferenciação e que este fator não estaria influenciando negativamente o processo de osteogênese em 21 dias de cultivo. As análises de expressão gênica para os esferoides induzidos por TGF-β3 estão em etapa de realização.

A matriz extracelular do tecido ósseo é secretada por osteoblastos e ela regula as funções celulares deste tecido, além de influenciar nas vias de sinalização celular. A matriz extracelular influencia o processo de diferenciação osteogênica das MSCs em osteoblastos, tanto por interação direta como por modular a atividade de fatores de crescimento (ALFORD *et al.*, 2015). A matriz extracelular do tecido ósseo é formada por uma porção orgânica composta majoritariamente por colágeno I, fibronectina, osteocalcina, osteopontina, osteonectina e proteoglicanas, como a bligicana. As proteínas de matriz extracelular do tecido ósseo interagem fortemente com a hidroxiapatita, a qual por sua vez protege a estrutura destas proteínas às alterações de temperatura ou à ação de reagentes químicos, por exemplo (COULSON-THOMAS *et al.*, 2015). Neste trabalho, análises de imuno-histoquímica para identificação de moléculas de matriz extracelular presentes no tecido ósseo e de moléculas adesivas, foram realizadas para avaliar a eficácia da diferenciação osteogênica nos esferoides de ASCs.

O colágeno I é a proteína colagenosa mais abundante no tecido ósseo, correspondendo a 90% da porção orgânica de sua matriz extracelular. A organização do colágeno I no tecido ósseo ocorre em estruturas hierárquicas, de

modo que o menor nível de hierarquia corresponde à molécula em tripla hélice (GARNERO et al., 2015). Neste trabalho, foi observada uma baixa marcação de colágeno I por imuno-histoquímica nos esferoides da condição controle, ao contrário dos esferoides induzidos por hrBMP-7. No entanto, pela análise por Q-PCR para a expressão de colágeno I em esferoides controles e induzidos por hrBMP-7, houve menos da metade da expressão desta proteína nos esferoides induzidos quando comparado com os esferoides controles, ao contrário do observado no trabalho de Fennema e colaboradores (2017), onde houve uma elevada expressão de colágeno I em esferoides de ASCs cultivados durante sete dias. Uma possibilidade de ter ocorrido uma menor expressão de colágeno I por Q-PCR e maior por imuno-histoquímica é devido a análise ter sido feita somente no final da indução, em três semanas de cultivo. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, não foi observada marcação por imuno-histoquímica de colágeno I em três semanas de cultivo, enquanto que em cinco semanas, houve uma elevada distribuição desta molécula no interior dos esferoides. Em consonância, no trabalho realizado por Hildebrandt e colaboradores (2011), foi observada uma elevada distribuição de colágeno I por imunofluorescência em esferoides de MSCs, produzidos a partir do método de gota pendente, induzidos para a via osteogênica utilizando dexametasona, ácido ascórbico e β-glicerofosfato.

Além do colágeno I, o presente trabalho avaliou a presença do colágeno II. O colágeno II é a proteína mais abundante na matriz extracelular da cartilagem articular (LUO *et al.*, 2017). A matriz extracelular do tecido cartilaginoso é responsável por regular o metabolismo e as funções dos condrócitos, como diferenciação, sobrevivência e as respostas a estímulos mecânicos (GAO *et al.*, 2014). Neste trabalho, foi observada a presença de colágeno II no interior dos esferoides induzidos por hrBMP-7, de forma mais elevada do que o colágeno I. No estudo realizado por SHI e colaboradores (2015) com esferoides produzidos a partir de condrócitos isolados de camundongos, foi visualizado por imunofluorescência a presença de colágeno II e de agrecana (constituinte da matriz extracelular do tecido cartilaginoso). Além disso, neste mesmo estudo, por Q-PCR, foi observada uma maior expressão destas moléculas quando cultivadas em 3D do que em monocamada. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, não foi observada distribuição de colágeno II em duas semanas de cultivo, ao final da indução condrogênica. No entanto, é importante ressaltar que em casos de

ossificação endocondral, no início da hipertrofia dos condrócitos, é observada uma redução da expressão de colágeno II (KUMAR *et al.*, 2018).

O colágeno VI, por mais que corresponda somente a 1% da composição da matriz extracelular da cartilagem articular, encontra-se amplamente distribuído na matriz pericelular (EYRE *et al.*, 2006; LUO *et al.*, 2017). Sua principal função é interagir com os condrócitos e manter sua integridade (LUO *et al.*, 2017). O colágeno VI liga-se a uma variedade de proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno II e o colágeno XIV, formando uma rede de proteínas que permite a ancoragem dos condrócitos (BIDANSET *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1994). Neste trabalho, no interior dos esferoides induzidos por TGF-β3 cultivados durante 2 semanas, foi observada uma distribuição desta proteína por imuno-histoquímica em toda a área dos esferoides, o que comprova a presença ainda de tecido de cartilagem neste estágio de diferenciação.

O colágeno X também está presente na cartilagem articular e apresenta uma associação direta com eventos de ossificação endocondral, uma vez que o mesmo é secretado somente por condrócitos hipertróficos, que estão nos estágios finais de diferenciação condrogênica. A função biológica do colágeno X está relacionada a facilitar a etapa de calcificação na ossificação endocondral, provavelmente por gerar modificações na estrutura da matriz extracelular (SHEN, 2005). Por imuno-histoquímica, foi observada a presença de colágeno X nos esferoides induzidos por hrBMP-7 e em menor proporção nos esferoides da condição controle. Até o momento, na literatura, não foram mostrados resultados do colágeno X em modelos de osteogênese em esferoides. No entanto, o mesmo já foi investigado em modelos de esferoides para diferenciação condrogênica, como no estudo realizado por Arufe e colaboradores (2011), através do qual foi observada uma baixa distribuição de colágeno X por imuno-histoquímica nos esferoides de MSCs, isoladas de cordão umbilical, induzidos para a via condrogênica durante todo o período de cultivo. Ao contrário, em modelos murinos de ossificação endocondral in vivo foi observado recentemente um aumento da distribuição de colágeno X por imuno-histoquímica, conforme ocorre a progressão da formação do tecido ósseo (HIROUCHI et al., 2017), assim como foi observado nos resultados realizados neste trabalho com esferoides produzidos a partir de hrBMP-7. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, houve uma alta distribuição de colágeno X em duas semanas - ao final da condrogênese - uma redução em três semanas (após uma semana no meio osteogênico) e um aumento da distribuição em cinco semanas (ao final da osteogênese). Em eventos de ossificação endocondral, há uma alta expressão de colágeno X durante a hipertrofia dos condrócitos (KUMAR *et al.*, 2018) e no trabalho realizado por Muraglia e colaboradores (2003), houve a presença de colágeno X por imuno-histoquímica em três semanas de cultivo no meio indutor da condrogênese.

A N-caderina é uma molécula de adesão que medeia as junções adesivas entre as células e, portanto, apresenta uma função importante durante o processo de morfogênese, formação tecidual e sua integridade. Além disso, as caderinas estão envolvidas diretamente em modular processos de sinalização celular (MARIE et al., 2014). Quando relacionada à osteogênese, resultados prévios mostraram que uma expressão prolongada de N-caderina é capaz de inibir a diferenciação osteogênica em MSCs por regular negativamente as vias de sinalização de β-catenina e ERK1 (do inglês extracellular signal regulated kinases) (XU et al., 2013). Foi observado que os níveis de mRNA de osteopontina, osteocalcina, RUNX2 e fosfatase alcalina foram significativamente inibidos pela N-caderina, assim como houve a inibição de formação de depósitos de cálcio quando analisados por Alizarina vermelha (XU et al., 2013). No presente trabalho, foi observada a presença de N-caderina em regiões dos esferoides da condição controle, enquanto que nos esferoides induzidos por hrBMP-7 foi observada a presença desta molécula de adesão somente em áreas próximas à periferia destes esferoides. No caso dos esferoides induzidos por TGF^{β3}, foi observada uma distribuição de N-caderina somente em cinco semanas de indução, a qual não foi elevada.

A agrecana é um proteoglicano específico da cartilagem que contém condroitina-sulfato e sulfato de queratano (NAKANO *et al.*, 2014). A agrecana forma agregados que permitem a hidratação da cartilagem e que auxiliam em sua resistência mecânica à compressão (DUDHIA, 2005). Em modelos de esferoides para diferenciação condrogênica, é observada uma alta expressão de agrecana por Q-PCR (MARKWAY *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011) e por imunofluorescência (GOUDE *et al.*, 2014). No estudo realizado por Weiss-Bilka e colaboradores (2016), esferoides de ASCs foram produzidos a partir de duas metodologias diferentes e induzidos para a via condrogênica, com o objetivo final

de serem implantados *in vivo* em um modelo de regeneração por ossificação endocondral. Foi observado a presença de agrecana (e de colágeno II) em baixa distribuição por imuno-histoquímica, ao passo que ocorria a progressão da hipertrofia dos esferoides. Após o implante, foi observada a formação ectópica de tecido ósseo com sucesso. No presente estudo, foi observado por imuno-histoquímica uma baixa distribuição de agrecana nos esferoides induzidos por TGF-β3 na segunda semana de cultivo (além de colágeno II), conforme houve uma elevada marcação de colágeno X, típico de condrócitos hipertróficos, corroborando com o trabalho de Weiss-Bilka e colaboradores (2016).

A osteopontina é produzida por osteoblastos durante o processo de osteogênese (HAYLOCK Е NILSSON, 2006), correspondendo а aproximadamente 2% do total de proteínas não colagenosas do tecido ósseo (MCKEE E NANCI, 1996; DENHARDT et al, 2001). A osteopontina já foi localizada em níveis elevados de mineralização deste tecido, porém, sua função em auxiliar a formação ou não dos cristais de hidroxiapatita ainda não foi completamente elucidada (Hunter, 2012). Em estudos prévios, foi observada uma elevada expressão de osteopontina Q-PCR em esferoides de MSCs, produzidos pela técnica de gota pendente, induzidos para a via osteogênica (HILDEBRANDT et al., 2011), inclusive quando comparada com a expressão desta mesma proteína em monocamada (YAMAGUCHI et al., 2014). Neste trabalho, não foi a observada a presença de osteopontina em esferoides induzidos por hrBMP-7 ou nos esferoides da condição controle. Porém, a osteopontina já foi relatada como um marcador da diferenciação terminal de condrócitos hipertróficos (HATTORI et al., 2010), de modo que a falta da expressão desta proteína nos esferoides induzidos por hrBMP-7 pode ter ocorrido devido ao não alcance neste estágio de diferenciação. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, também não foi observada a presença de osteopontina em três semanas de indução, enquanto que em cinco semanas, houve distribuição desta proteína, preferencialmente na população de células deslocada lateralmente.

A osteocalcina é uma das proteínas não colagenosas mais abundantes na matriz extracelular do tecido ósseo (MIZOKAMI *et al.*, 2017). Ela é secretada por osteoblastos durante o período de maturação óssea, motivo pelo qual sempre foi utilizada como um marcador importante para a osteogênese (ZOCH *et al.*, 2016). Suas principais funções descritas até o momento são a regulação da mineralização óssea e atuar no metabolismo esquelético, apresentando um papel endócrino (ZOCH *et al.*, 2016). No estudo realizado por Gurumurthy e colaboradores (2016), foi realizada a comparação da eficácia da diferenciação de esferoides de ASCs com o cultivo destas células em monocamada. Um dos parâmetros utilizados foi a produção de osteocalcina, a qual foi insignificante em monocamada quando comparada nos esferoides de ASCs. Nos esferoides, foi observada uma elevada quantidade de osteocalcina total ao final da terceira semana de indução. No presente estudo, foi observada distribuição de osteocalcina próxima à periferia nos esferoides induzidos por hrBMP-7. Já nos esferoides induzidos por TGF- β 3, houve um aumento da produção de osteocalcina a partir de três semanas de indução, o que corroborou com o observado no trabalho de Muraglia e colaboradores (2003).

O proteoglicano biglicana apresenta um papel na regulação da formação óssea e foi um dos primeiros componentes descritos da matriz extracelular deste tecido (NASTASE et al., 2012). A biglicana também atua na diferenciação osteoblástica através da via de sinalização pela proteína morfogênica óssea 4 (BMP-4) (PARISUTHIMAN et al., 2005). O estudo realizado por Coulson-Thomas e colaboradores (2015), corroborou a importância da biglicana na formação óssea pela visualização de sua localização por imuno-histoquímica próxima a ósteons do tecido ósseo trabecular. No trabalho realizado por Burns e colaboradores (2010), esferoides de MSCs foram formados utilizando arcabouços de cerâmica e induzidos para a via osteogênica. Em osteoblastos considerados no estágio de maturação foi observada, por imuno-histoquímica uma distribuição intensa de biglicana. No presente estudo, porém, os esferoides induzidos através da hrBMP-7, houve baixa composição de biglicana, provavelmente devido aos esferoides não terem alcançado o estágio de maturação da diferenciação osteogênica. No entanto, nos esferoides induzidos por TGF-β3 houve um aumento da distribuição desta proteína a partir da terceira semana de indução.

A tenascina C é uma glicoproteína expressa de forma transiente durante a embriogênese e organogênese (CHIQUET-EHRISMANN E TUCKER, 2004). No tecido ósseo adulto, a tenascina C está localizada no periósteo e no endósteo (SCHERBERICH *et al.*, 2004). Por imuno-histoquímica, a tenascina C, também
já foi observada nos ligamentos periodontais (SATO *et al.*, 2015). Funcionalmente, esta glicoproteína regula, por múltiplos mecanismos, a diferenciação osteoblástica e a proliferação celular (MORGAN et al., 2011). Neste estudo, foi observada uma distribuição de tenascina C nos esferoides induzidos por hrBMP-7, na população de células deslocada lateralmente e na periferia dos esferoides controles. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, não foi verificada distribuição de tenascina-C em três semanas, enquanto que em cinco semanas, houve uma alta distribuição desta proteína, principalmente na população de células deslocada lateralmente e na população de células deslocada lateralmente a população de células deslocada lateralmente. Até o momento, poucos estudos foram realizados associando a tenascina C com modelos de diferenciação osteogênica a partir de MSCs ou ASCs. No entanto, em esferoides produzidos a partir de células diferenciadas, houve uma elevada expressão de tenascina C por Q-PCR (KRAUS *et al.*, 2017).

A TSP-1 é uma proteína envolvida na inibição da angiogênese e na antihipertrofia dos condrócitos no tecido cartilaginoso (SHI et al., 2013). Ela é secretada por muitos tipos celulares, incluindo osteoblastos e células tumorais (Shi et al., 2013). A TSP-1 é responsável por inibir a diferenciação osteoblástica, como foi comprovado pelo estudo de Dubose e colaboradores (2012), de modo que o bloqueio da TSP-1 promoveu um aumento na expressão de RUNX-2 e de fosfatase alcalina. No trabalho de regeneração da cartilagem articular in vivo feito por Gelse e colaboradores (2011), foi observado por imuno-histoquímica que a TSP-1 inibiu o processo de ossificação endocondral, assim como não induziu o processo de condrogênese. Neste estudo, foi observada uma alta distribuição de TSP-1 por imuno-histoquímica nos esferoides induzidos por hrBMP-7 (resultados não mostrados). No entanto, foi observado por Q-PCR uma baixa expressão relativa de TSP-1 nos esferoides induzidos por hrBMP-7 quando comparado aos esferoides controles. Nos esferoides induzidos por TGF-β3, houve uma baixa marcação desta proteína em duas semanas de cultivo, porém houve uma maior distribuição desta em três semanas de cultivo, período em que houve uma redução da produção de colágeno X (secretado por condrócitos em estágio de hipertrofia), enquanto que em cinco semanas houve redução da distribuição de TSP-1, o que é uma vantagem, visto que ela é uma proteína anti-osteogênica. A marcação de TSP-1 em cinco semanas também corroborou com a distribuição de colágeno X neste período, que aumentou em relação a três semanas.

Portanto, esferoides induzidos por hrBMP-7, em três semanas de cultivo, não apresentaram a composição da matriz extracelular típica do tecido ósseo, porém, foi observada marcação de proteínas do tecido cartilaginoso, como colágeno II e colágeno X. Já os esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram nas semanas iniciais de indução, uma maior marcação de TSP-1 e colágeno X, porém uma baixa marcação para proteínas típicas do tecido ósseo. Em cinco semanas de cultivo, houve uma diminuição da produção de TSP-1 e um aumento de proteínas típicas da matriz extracelular do tecido ósseo, como colágeno I e osteocalcina.

Em resumo, esferoides induzidos por hrBMP-7 por 3 semanas apresentaram depósitos de cálcio em seu interior e uma alta expressão de ALP. No entanto, por imuno-histoquímica, não houve uma elevada distribuição de proteínas de matriz extracelular presentes no tecido ósseo, baixa secreção dos mediadores osteogênicos. Além disso, a força de resistência mecânica à compressão nos esferoides induzidos foi inferior em relação aos esferoides controles.

A funcionalidade dos esferoides induzidos para a via osteogênica por TGF-β3 foi comprovada através da presença de (1) uma maior marcação de depósitos de cálcio por Alizarina vermelha em cinco semanas de cultivo, (2) marcadores de matriz extracelular característicos do tecido ósseo em cinco semanas de cultivo e pela (3) elevada resistência mecânica à compressão nos esferoides induzidos em comparação com os esferoides controles ao longo das semanas de cultivo.

Neste trabalho, foi possível padronizar um modelo de indução osteogênica *in vitro* de esferoides de ASCs humanas, abrindo uma nova perspectiva para a medicina regenerativa. Os esferoides biofabricados neste trabalho podem ser utilizados como uma ferramenta biomédica para o tratamento de lesões ósseas críticas e de doenças como osteoporose e osteoartrite, que são crescentes no atual cenário de aumento da expectativa de vida no Brasil e no mundo.

110

7. CONCLUSÕES

- Esferoides de ASCs induzidos por hrBMP-7 em três semanas de cultivo não apresentaram uma elevada funcionalidade em relação a (1) secreção de mediadores solúveis, (2) resistência mecânica a compressão e (3) composição de moléculas de matriz extracelular típicas do tecido ósseo, não alcançando o grau de diferenciação osteogênica esperado.
- Esferoides induzidos por TGF-β3 apresentaram uma maior eficácia de diferenciação osteogênica *in vitro* em comparação com os esferoides induzidos por hrBMP-7 em relação à formação de matriz extracelular e resistência à compressão mecânica.
- Foi possível padronizar um modelo de indução osteogênica de esferoides de células-tronco de tecido adiposo humano fabricados pela técnica de hidrogel de agarose micromoldado, homogêneos em tamanho e forma, para aplicações em engenharia óssea.

8. PERSPECTIVA

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, a perspectiva é que os esferoides induzidos inicialmente pelo TGF-β3 (condição 2 descrita neste trabalho), após implante em um local de lesão óssea crítica, sejam capazes de atrair mais rapidamente vasos sanguíneos, auxiliando o processo de diferenciação osteogênica e produção de matriz óssea nos esferoides e, consequentemente, favorecendo a regeneração óssea (Fig. 33).



Figura 33: Esferoides induzidos por TGF-β3 como um modelo *in vivo* de ossificação para promover uma regeneração óssea eficiente. Esferoides préinduzidos são implantados no local da lesão (A). Esferoides induzidos atraem vasos sanguíneos para o local (B) e o processo de regeneração óssea é iniciação (C) (Baptista, Kronemberger *et al.*, 2018).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A. Cell culture: biology's new dimension. Nature, v. 424, p. 870-872, 2003.

ACHILLI, T-M., MEYER J., MORGAN J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. Expert Opinion on Biological Therapy, v. 12, p. 1347-1360, 2012.

AÇIL, Y., SPRINGER, I.N.G., BROEK, V., TERHEYDEN, H., JEPSEN, S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. Journal of Cellular Biochemistry, v. 86, p. 90-98, 2002.

ALFORD, A. I., HANKENSON, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. Bone, v. 38, p. 749-757, 2006.

ALFORD, A.I., KOZLOFF, K.M., HANKENSON, K.D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 65, p. 20-31, 2015.

ANADA, T., FUKUDA, J., SAI, Y., SUZUKI, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. Biomaterials, v. 33, p. 8430-8441, 2012.

BAILEY DUBOSE, K., ZAYZAFOON, M., MURPHY-ULLRICH, J.E. Thrombospondin-1 inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through latent TGF- β activation. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 422, p. 488-493, 2012.

BALA, Y., SEEMAN, E. Bone's material constituents and their contribution to bone strength in health, disease, and treatment. Calcified Tissue International, v. 97, p. 308-326, 2015.

BAPTISTA, L.S., PEDROSA, C.G.S., SILVA K.R., OTAZÚ, I.B., TAKYIA, C.M., DUTRA, H.S., CLÁUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R., ROSSI, M.I.D. Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How Close Are They? Journal of Stem Cells, v.2, 2007.

BAPTISTA, L., DO AMARAL, R., CARIAS, R., ANICETO, M., CLAUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. Cytotherapy, v. 11, p. 706-715, 2009.

BARON, R. Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

BARABASCHI, G., MANOHARAN, V., LI, Q., BERTASSONI, L. Engineering Pre-Vascularized Scaffolds for Bone Regeneration. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 881, p. 79-94, 2016.

BARANIAK, P.R., MCDEVITT, T.C. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. Cell and Tissue Research, v. 347, p. 701-711, 2012.

BASTIDAS-CORAL, A.P., BAKKER, A.D., ZANDIEH-DOULABI, B., KLEVERLAAN, C.J., BRAVENBOER, N., FOROUZANFAR, T., KLEIN-NULEND, J. Cytokines TNF- α , IL-6, IL-17F, and IL-4 differentially affect osteogenic differentiation of human adipose stem cells. Stem Cells International, v. 2016, p. 1-9, 2016.

BEACHLEY, V., KASYANOV, V., NAGY-MEHESZ, A., NORRIS, R., OZOLANTA, I., KALEJS, M., STRADINS, P., BAPTISTA, L., DA SILVA, K., GRAINJERO, J., WEN, X., MIRONOV, V. The fusion of tissue spheroids attached to pre-stretched electrospun polyurethane scaffolds. Journal of Tissue Engineering, v. 5, p. 1-11, 2014.

BIDANSET, D.J., GUIDRY, C., ROSENBERG, L.C., CHOI, H.U., TIMPI, R., HOOK, M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. Journal of Biological Chemistry, v. 267, p. 5250-5256, 1992.

BONJOUR, J-P. Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. Journal of the American College of Nutrition, v. 30, p. 438-448, 2011.

BOURIN P, BUNNELL B, CASTEILLA L, DOMINICI M, KATZ A, MARCH K, REDL H, RUBIN J, YOSHIMURA K, GIMBLE J. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society. Cytotherapy, v. 15, p. 641–648, 2013.

BRETT, E., FLACCO, J., BLACKSHEAR, C., LONGAKER, M., WAN, D. Biomimetics of Bone Implants: The Regenerative Road. Bioresearch Open Access, v. 61, p. 1-6, 2017.

BROWN, J.C., GOLBIK, R., MANN, K., TIMPL, R. Structure and stability of the triplehelical domains of human collagen XIV. Matrix Biology, v. 14, p. 287-295, 1994.

BRUDERER, M., RICHARDS, R.G., ALINI, M., STODDART, M. J. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis, v. 28, p. 269-286, 2014.

BULANOVA, E.A., KOUDAN, E.V., DEGOSSERIE, J., HEYMANS, C., PEREIRA, F.D., PARFENOV, V.A., SUN, Y., WANG, Q., AKHMEDOVA, S.A., SVIRIDOVA, I.K., SERGEEVA, N.S., FRANK, G.A., KHESUANI, Y.D., PIERREUX, C.E., MIRONOV, V.A. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct. Biofabrication, v. 9, p. 1-14, 2017.

BURNS, J.S., RASMUSSEN, P.L., LARSEN, K.H., SCHRØDER, H.D., KASSEM, M. Parameters in three-dimensional osteospheroids of telomerized human mesenchymal (stromal) stem cells grown on osteoconductive scaffolds that predict in vivo bone-forming potential. Tissue Engineering Part A, v. 16, p. 2331-2342, 2010.

CAO, X., CHEN, D. The BMP signaling and in vivo bone formation, v. 357, p. 1-8, 2005.

CARREIRA A, LOJUDICE F, HALCSIK E, NAVARRO R, SOGAYAR M, GRANJEIRO J. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. Journal of dental research, v. 93, p. 335-345, 2014.

CHEN, J., SHI, Z-D., JI, X., MORALES, J., ZHANG, J., KAUR, N., WANG, S. Enhanced Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells by Periodic Heat Shock in Self-Assembling Peptide Hydrogel. Tissue engineering: part a, v. 19, p. 716-728, 2013.

CHIQUET-EHRISMANN, R., TUCKER, R.P. Connective tissues: signalling by tenascins. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 36, p. 1085-1089, 2004.

CHONG, P. P., SELVARATNAM, L., ABBAS, A. A., KAMARUL, T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. Journal of Orthopedic Research, v. 30, p. 634-642, 2012.

CHRISTIE, C., ZHONG, A., WILLIAMS, B. Manipulating WNT Receptors to Affect Osteogenesis, 2017.

CIRANO, F.R., TOGASHI, A.Y., MARQUES, M.M., PUSTIGLIONI, F.E., LIMA, L.A. Role of rhBMP-2 and rhBMP-7 in the metabolism and differentiation of osteoblast-like cells cultured on chemically modified titanium surfaces. The Journal of Oral Implantology, v. 40, p. 655-659, 2014.

COIMBRA, I. B., PASTOR, E. H., GREVE, J. M. D., PUCCINELLI, M. L. C., FULLER, R., CAVALCANTI, F. S., MACIEL, F. M. B., HONDA, E. Osteoartrite (artrose): tratamento. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 44, p. 450-453, 2004.

COULSON-THOMAS, Y.M., COULSON-THOMAS, V.J., NORTON, A.L., GESTEIRA, T.F., CAVALHEIRO, R.P., MENEGHETTI, M.C., MARTINS, J.R., DIXON, R.A., NADER, H.B. The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. Plos One, v. 10, p. 1-21, 2015.

CIUFFI, S., ZONEFRATI, R., BRANDI, M.L. Adipose stem cells for bone tissue repair. Clinical Cases Mineral Bone Metabolism, v. 14, p. 217-226, 2017.

SILVA, K.R., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J.R., CLAUDIO-DA-SILVA, C., MAYA-MONTEIRO, C.M., BOROJEVIC, R., BAPTISTA, L.S. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. Stem Cell Research and Therapy, v. 6, p. 1-13, 2015.

SILVA, K., CÔRTES, I., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J.R., SOUZA, A.A., BOROJEVIC, R., MAYA-MONTEIRO, C.M., BAPTISTA, L.S. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. PloS One, v. 12, p. 1-15, 2017.

DA SILVA, ISIS CÔRTES TEIXEIRA. Biofabricação de cartilagem a partir de esferoides de células-tronco de tecido adiposo humano. Duque de Caxias, 2017. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

DANILEVICIUS, P., REZENDE, R.A., PEREIRA, F.D., SELIMIS, A., KASYANOV, V., NORITOMI, P., DA SILVA, J.V., CHATZINIKOLAIDOU, M., FARSARI, M., MIRONOV, V. Burr-like, laser-made 3D microscaffolds for tissue spheroid encagement. Biointerphases, v. 10, p. 1-12, 2015.

DOMINGOS, M., GLORIA, A., COELHO, J., BARTOLO, P., CIURANA, J. Threedimensional printed bone scaffolds: The role of nano/micro-hydroxyapatite particles on the adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2017. DENHARDT, D.T., GIACHELLI, C.M., RITTLING, S.R. Role of osteopontin in cellular signaling toxicant injury. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 41, p. 723–749, 2001.

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

DUDHIA, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 62, p. 2241-2256, 2005.

DUGUAY, D., FOTY, R. A., STEINBERG, M.S. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. Development Biology, v. 2532, p. 309-323, 2003.

ELBERT, D. L. Bottom-up tissue engineering. Current Opinion in Biotechnology, v. 22, p. 674-680, 2011.

EYRE, D.R., WEIS, M.A., WU, J.J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? European Cells and Materials, v. 12, p. 57–63, 2006.

FENNEMA, E.M., TCHANG, L.A.H., YUAN, H., VAN BLITTERSWIJK, C.A., MARTIN, I., SCHERBERICH, A., DE BOER, J. Ectopic bone formation by aggregated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 12, p. 1-28, 2017.

FILIPOWASKA, J., TOMASZEWSKI, KA., NIEDZWIEDZKI, L., WALOCHA, JA., NIEDZWIEDZKI, T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. Angiogenesis, p. 1-12, 2017.

FINDLAY, D. M., ATKINS, G. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. Current Osteoporosis Reports, v. 12, p. 127-134, 2014.

FRESE, L, DIJKMAN, PE., HOERSTRUP, SP. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. Transfusion Medicine and Hemotherapy, v. 43, p. 268-274, 2016.

FREEMAN, F. E., STEVENS, H. Y., OWENS, P., GULDBERG, R. E. MCNAMARA, L. M. Osteogenic differentiation of MSCs by mimicking the cellular niche of the endochondral template. Tissue Engineering, p. 1-51, 2015.

FREEMAN, F. E., MCNAMARA, L. M. Endochondral Priming: A Developmental Engineering Strategy for Bone Tissue Regeneration. Tissue Engineering, p. 1-39, 2016. GALI, J. C. Osteoporose. ACTA Ortop. Bras., v. 9, p. 3-12, 2001.

FRIEDENSTEIN, A.J., PETRAKOVA, K.V., KUROLESOVA, A.I., FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, v. 6, p. 230-247, 1968.

FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell and Tissue Kinetics, v. 3, p. 393-402, 1970.

FRIEDENSTEIN, A.J., DERIGLASOVA, U.F., KULAGINA, N.N., PANASUK, A.F., RUDAKOWA, S.F., LURIÁ, E.A., RUADKOW, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Experimental Hematology, v. 2, p. 83-92, 1974.

GARNERO, P. The role of collagen organization on the properties of bone. Calcified Tissue International, v. 97, p. 229-240, 2015.

GELSE, K., KLINGER, P., KOCH, M., SURMANN-SCHMITT, C., VON DER MARK, K., SWOBODA, B., HENNIG, F.F., GUSINDE, J. Thrombospondin-1 prevents excessive ossification in cartilage repair tissue induced by osteogenic protein-1. Tissue Engineering Part A, v. 17, p. 2101-2112, 2011.

GOUDE, M.C., MCDEVITT, T.C., TEMENOFF, J.S. Chondroitin sulfate microparticles modulate transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cell spheroids. Cells, Tissues, Organs, v. 199, p. 117-130, 2014.

W. L. GRAYSON, B. A. BUNNELL, E. MARTIN, T. FRAZIER, B. P. HUNG and J. M. GIMBLE. Nature Reviews Endocrinology, v. 11, 2015.

GRUBER, J., YEE, Z., TOLWINSKI, NS. Developmental Drift and the Role of Wnt Signaling in Aging. Cancers, v. 8, 2016.

GUDURIC, V., METZ, C., SIADOUS, R., BAREILLE, R., LEVATO, R., ENGEL, E., FRICAIN, J-C., DEVILLARD, R., LUZANIN, O., CATROS, S. Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. Tissue engineering constructs and cell substrates, v. 78, p. 1-11, 2017.

GURUMURTHY, B., BIERDEMANM P.C., JANORKAR, A.V. Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells. Journal of Biomedical Materials Research, v. 105, p. 1230-1236, 2017.

HAO, Z., SONG, Z., HUANG, J., HUANG, K., PANETTA, A., GU, Z., WU, J. The scaffold microenvironment for stem cell-based bone tissue engineering. Biomaterials Science, 2017.

HALL, B.K., MIYAKE, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. Bioessays, v. 22, p. 138-147, 2000.

HATA, K., TAKAHATA, Y., MURAKAMI, T., NISHIMURA, R. Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. Journal of Bone Metabolism, v. 24, p. 75-82, 2017.

HAYLOCK, D.N., NILSSON, S.K. Osteopontin: a bridge between bone and blood. British Journal of Haematology, v. 134, p. 1-8, 2006.

HAYRAPETYAN, A., JANSEN, J. A., VAN DEN BEUCKEN, J. J. J. P. Signaling Pathways Involved in Osteogenesis and Their Application for Bone Regenerative Medicine. Tissue engineering: part b, v. 21, p. 75-87, 2015.

HATTORI, T., MÜLLER, C., GEBHARD, S., BAUER, E., PAUSCH, F., SCHLUND, B., BÖSL, M.R., HESS, A., SURMANN-SCHMITT, C., VON DER MARK, H., DE CROMBRUGGHE, B., VON DER MARK, K. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. Development, v. 137, p. 901-911, 2010. HERRMANN, M., VERRIER, S., ALINI, M. Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair. Frontier Bioengineering Biotechnology, v. 3, p. 1-11, 2015.

HILDEBRANDT, C., BÜTH, H., THIELECKE, H. A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells. Tissue and Cell, v. 43, p. 91-100, 2011.

HINDERER, S., LAYLAND, S., SCHENKE-LAYLAND, K. ECM and ECM-like materials — Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 96, p. 260-269, 2015.

HIROUCHI, H., KITAMURA, K., YAMAMOTO, M., ODAKA, K., MATSUNAGA, S., SAKIYAMA, K., ABE, S. Developmental characteristics of secondary cartilage in the mandibular condyle and sphenoid bone in mice. Archives of Oral Biology, v. 89, p. 84-92, 2018.

HO, S.S., MURPHY, K.C., BINDER, B.Y., VISSERS, C.B., LEACH, J.K. Increased survival and function of mesenchymal stem cell spheroids entrapped in instructive alginate hydrogels. Stem Cells Translational Medicine, v. 5, p. 773-781, 2016.

HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M. S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A. T., DE BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacological Reviews, v. 56, p. 549-580, 2004.

HSU, S.H., HSIEH, P.S. Self-assembled adult adipose-derived stem cell spheroids combined with biomaterials promote wound healing in a rat skin repair model. Wound Repair and Regeneration, v. 23, p. 57-64, 2015.

HU, K., OLSEN, B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. Bone, v. 91, p. 30-38, 2016.

HUANG, G.S., DAI, L.G., YEN, B.L., HSU, S.H. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. Biomaterials, v. 32, p. 6929-6945, 2011.

HUANG, R.L., SUN, Y., HO, C.K., LIU, K., TANG, Q.Q., XIE, Y., LI, Q. IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPR1A-mediated pathways. Cell Death and Disease, v. 9, p. 1-15, 2018.

HUNTER, G.K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. Calcified Tissue International, v. 93, p. 348-354, 2013.

HUTMACHER, D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. Biomaterials Science, v. 12, p. 107-124, 2001.

IN'T ANKER, P. S., SCHERJON, S. A., KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C., DE GROOT-SWINGS, G. M., CLAAS, F. H., FIBBE, W. E., KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells, v. 22, p.1338-1345 (2004).

JING, W., SMITH, A. A., LIU, B., LI, HUNTER, D. J., DHAMDHERE, G., SALMON, B., JIANG, J., CHENG, D., JOHNSON, C. A. Reengineering autologous bone grafts with the stem cell activator WNT3A. Biomaterials, v. 47, p. 29-40, 2015.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. Histologia Básica. Guanabara Koogan, 10^a ed, 2008.

KAPUR, S.K., WANG, X., SHANG, H., YUN, S., LI, X., FENG, G., KHURGEL, M., KATZ, A.J. Human adipose stem cells maintain proliferative, synthetic and multipotential properties when suspension cultured as self-assembling spheroids. Biofabrication, v. 4, p. 1-28, 2012.

KARSENTY, G. Transcriptional control of skeletogenesis. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 9, p. 183-196, 2008.

KELM, J. M., FUSSENEGGER, M. Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 62, p. 753-764, 2010.

KHADEMHOSSEINI, A., LANGER R., BORENSTEIN, J., VACANTI, J. P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. PNAS, v. 7, p.1038-2480, 2006.

KIM, C.K., RHEE, J.I. Optimization of extracellular production of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) with Bacillus subtilis. Journal of Microbiology an Biotechnology, v. 24, p. 188-196, 2014.

KIM, HJ., PARK, J-S. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. Development and Reproduction, v. 21, p. 1-10, 2017.

KOZHEMYAKINA, E., LASSAR, A.B., ZELZER, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. Development, v. 142, p. 817-831, 2015.

KRAUS, A., LUETZENBERG, R., ABUAGELA, N., HOLLENBERG, S., INFANGER, M. Spheroid formation and modulation of tenocyte-specific gene expression under simulated microgravity. Muscles, Ligaments and Tendons Journal, v. 7, p. 411-417, 2018.

KUMAR, Y., BISWAS, T., THACKER, G., KANAUJIYA, J.K., KUMAR, S., SHUKLA, A., KHAN, K., SANYAL, S., CHATTOPADHYAY, N., BANDYOPADHYAY, A., TRIVEDI, A.K. BMP signaling-driven osteogenesis is critically dependent on Prdx-1 expressionmediated maintenance of chondrocyte prehypetrophy. Free Radical Biology and Medicine, v. 118, p. 1-12, 2018.

LAMMERS, L., NAUJOKS, C., BERR, K., DEPPRICH, R., KÜBLER, N., MEYER, U., LANGENBACH, F., LÜTTENBERG, B., KÖGLER, G., WIESMANN, H.P., HANDSCHEL, J. Impact of DAG stimulation on mineral synthesis, mineral structure and osteogenic differentiation of human cord blood stem cells. Stem Cell Research, v. 8, p. 193-205, 2012.

LANGENBACH, F., NAUJOKS, C., KERSTEN-THIELE, P.V., BERR, K., DEPPRICH, R.A., KUBLER, N.R., KOGLER, G., HANDSCHEL, J. Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. Tissue Engineering Part A, v. 16, p. 759-766, 2010.

LANGENBACH, F., NAUJOKS, C., SMEETS, R., BERR, K., DEPPRICH, R., KÜBLER, N., HANDSCHEL, J. Scaffold-free microtissues: differences from monolayer cultures and their potential in bone tissue engineering. Clinical Oral Investigations, v. 17, p. 9-17, 2013.

LASCHKE, M., SCHANK, T., SCHEUER, C., KLEER, S., SHADMANOV, T., EGLIN, D., ALINI, M., MENGER, M. In vitro osteogenic differentiation of adipose-derived

mesenchymal stem cell spheroids impairs their in vivo vascularization capacity inside implanted porous polyurethane scaffolds. Acta Biomaterialia, p. 1-23, 2014.

LI, J., DONG, S. The signaling pathways involved in chondrocyte differentiation and hypertrophic differentiation. Stem Cells International, v. 2016, p. 1-12, 2016.

LIAN, JB., STEIN, GS., JAVED, A., VAN WIJNEN, AJ., STEIN, JL., MONTECINO, M., HASSAN, MQ., GAUR, T., LENGNER, CJ., YOUNG, DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, v. 7, p. 1–16, 2006.

LIAO, J., HU, N., ZHOU, N., LIN, L., ZHAO, C., YI, S., FAN, T., BAO, W., LIANG, X., CHEN, H., XU, W., CHEN, C., CHENG, Q., ZENG, Y., SI, W., YANG, Z., HUANG, W. Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. Plos One, v. 9, p. 1-13, 2013.

LIAO, HT., CHEN, CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. World Journal of Stem Cells, v. 6, p. 288-295, 2014.

LINDROOS, B., SUURONEN, R., MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. Stem Cells Reviews and Reports, v. 7, p. 269-291, 2011.

LIU, TM., LEE, EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. Tissue Engineering Part B: Reviews, v. 19, p. 254-263, 2013.

LIU, Y.C., KAO, Y.T., HUANG, W.K., LIN, K.Y., WU, S.C., HSU, S.C., SCHUYLER, S.C., LI, L.Y., LEIGH LU, F., LU, J. CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. Bioscience Trends, v. 8, p. 138-143, 2014.

LOEBEL, C., CZEKANSKA, E.M., BRUDERER, M., SALZMANN, G., ALINI, M., STODDART, M.J. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. Tissue Engineering Part A, v. 21, p. 115-123, 2015.

LU, T., LI, Y., CHEN, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. International journal of nanomedicine, v. 8, p. 337-350, 2015.

LU, L., ZHANG, X., ZHANG, M., ZHANG, H., LIAO, L., YANG, T., ZHANG, J., XIAN, L., CHEN, D., WANG, M. RANTES and SDF-1 are keys in cell-based therapy of TMJ osteoarthritis. Journal of Dental Research, v. 94, p. 1601-1609, 2015.

LUO, Y., SINKEVICIUTE, D., HE, Y., KARSDAL, M., HENROTIN, Y., MOBASHERI, A., ÖNNERFJORD, P., BAY-JENSEN, A. The minor collagens in articular cartilage. Protein and Cell, v. 8, p. 560-572, 2017.

LUTOLF, M. P., HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nature Biotechnology, v. 23, p. 47-55, 2005.

LUYTEN, F.P., CUNNINGHAM, N.S., MA, S., MUTHUKUMARAN, N., HAMMONDS, R.G., NEVINS, W.B., WOODS, W.I., REDDI, A.H. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. The Journal of Biological Chemistry, v. 264, p. 13377–13380, 1989.

MACKIE, EJ., TATARCZUCH, L., MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. Journal of Endocrinology, v. 211, p. 109–121, 2011.

MAES, C., KOBAYASHI, T., SELIG, M.K., TORREKENS, S., ROTH, S.I., MACKEM, S., CARMELIET, G., KRONENBERG, H.M. Osteoblast Precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. Developmental Cell, v. 19, p. 329-344, 2010.

MAJIDINIA, M., ALIZADEH, E., YOUSEFI, B., AKBARZADEH, M., ZARGHAMI, N. Downregulation of Notch Signaling Pathway as an Effective Chemosensitizer for Cancer Treatment. Drug Research, 2016.

MARIE, P.J., HAŸ, E., SAIDAK, Z. Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 25, p. 567-575, 2014.

MARUOTTI, N., CORRADO, A., CANTATORE, F. P. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. Journal of Celular Phisiology, v. 232, p. 2957-2963, 2017.

MARKWAY, B.D., TAN, G.K., BROOKE, G., HUDSON, J.E., COOPER-WHITE, J.J., DORAN, M.R. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. Cell Transplantation, v. 19, p. 29-42, 2010.

MATHIEU, M., RIGUTTO, S., INGELS, A., SPRUYT, D., STRICWANT, N., KHARROUBI, I., ALBARANI, V., JAYANKURA, M., RASSCHAERT, J., BASTIANELLI, E., GANGJI, V. Decreased pool of mesenchymal stem cells is associated with altered chemokines serum levels in atrophic nonunion fractures. Bone, v. 53, p. 391–398, 2013.

MATSUI, RENATA AKEMI DE MORAIS. Investigação do secretoma de esferoides em ensaios in vitro de diferenciação condrogênica. Duque de Caxias, 2017. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

MCKEE, M.D., NANCI, A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. Connective Tissue Research, v. 35, p. 197–205, 1996.

MEHESZ, A.N., BROWN, J., HAJDU, Z., BEAVER, W., DA SILVA, J.V., VISCONTI, R.P., MARKWALD, R.R., MIRONOV, V. Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids. Biofabrication, v. 3, p. 1-16, 2011.

MIRON, RJ., ZHANG, YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. Journal of Dental Research, v. 91, p. 736-744, 2012.

MIZOKAMI, A., KAWAKUBO-YASUKOCHI, T., HIRATA, M. Osteocalcin and its endocrine functions. Biochemical Pharmacology, v. 132, p. 1-8, 2017.

MORAES, L., SILVA, E., SILVA, D., PAULA, A. Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 - 2010): análise dos fatores associados. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 17, p. 719-734, 2014.

MORGAN, J.M., WONG, A., YELLOWLEY, C.E., GENETOS, D.C. Regulation of tenascin expression in bone. Journal of Cellular Biochemistry, v. 112, p. 3354-3363, 2011.

MURAGLIA, A., CORSI, A., RIMINUCCI, M., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., BIANCO, P., QUARTO, R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. Journal of Cell Science, v. 116, p. 2949-2955, 2003.

MURPHY, K., FANG, S., LEACH, J. Human Mesenchymal Stem Cell Spheroids in Fibrin Hydrogels Exhibit Improved Cell Survival and Potential for Bone Healing. Cell tissue research, v. 357, p. 91-99, 2014.

NASTASE, M.V., YOUNG, M.F., SCHAEFER, L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 60, p. 963-975, 2012.

NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R., DE CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell, v. 108, p. 17–29, 2002.

NAKANO, T., SRICHAMROEN, A., OZIMEK, L. Extraction of aggrecan-peptide from cartilage by tissue autolysis. Recent patents on food, nutrition and agriculture, v. 6, p. 54-59, 2014.

NAPOLITANO, A. P., DEAN, D. M., MAN, A.J., YOUSSEF, J., HO, D.N., RAGO, A.P., LECH, M.P., MORGAN, J. R. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded non adhesive hydrogels. Biotechniques, v. 43, p. 494–500, 2007.

NG, J., SPILLER, K., BERNHARD, J., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Biomimetic approaches for bone tissue engineering. Tissue Engineering, p. 1-53, 2016.

NGUYEN, L H., ANNABI, N., NIKKHAH, M., BAE, H., BINAN, L., BINAN, L., PARK, S., KANG, Y., YANG, Y., KHADEMHOSSEINI, A. Vascularized Bone Tissue Engineering: Approaches for Potential Improvement. Tissue Engineering: Part B, v. 18, p. 363-382, 2012.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. Materials today, v. 14, p. 88-95, 2011.

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.

PAIVA, KB., GRANJEIRO, JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 561, p. 74-87, 2014.

PEI ET AL. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. Orthodpedic Craniofacial Research, v. 8, p. 11–17, 2017.

PETRENKO, Y., SYKOVÁ, E., KUBINOVÁ, Š. The therapeutic potential of threedimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. Stem Cell Research and Therapy, v. 8, p. 1-9, 2017. PINHEIRO, M. M., CICONELLI, R. M., JACQUES, N. O., GENARO, P. S., MARTINI, L. A., FERRAZ, M. B. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos – *The Brazilian Osteoporosis Study* (BRAZOS). Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, p. 113-127, 2010.

PITTENGER, MF., MACKAY, AM., BECK, SC., JAISWAL, RK., DOUGLAS, R., MOSCA, JD., MOORMAN, MA., SIMONETTI, DW., CRAIG, S., MARSHAK, DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v. 284, p. 143-147, 1999.

POLIMERY, A., GIANNOBILE, WV., KAIGLER, D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Hormone and Metabolic Research, v. 48, p. 700–713, 2016.

REZENDE, R. A., PEREIRA, F. D. A. S., KASYANOV, V., MAIA, K. I., DA SILVA, J. V. L., MIRONOV, V. Scalable Biofabrication of Tissue Spheroids for Organ Printing. Procedia CIRP 5, p. 276-281, 2013.

ROLDÁN, J. C., DETSCH, R., SCHAEFER, S., CHANG, E., KELANTAN, M., WAISS, W., REICHERT, T. E., GURTNER, G. C., DEISINGER, U. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic model. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, v. 38, p. 423-430, 2010.

ROMANOV, Y. A., SVINTSITSKAYA, V. A., SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of post-natal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells, v. 21, p. 105-110, 2003.

ROSS, H. M., PAWLINA, W. Histologia – Texto e Atlas. Guanabara Koogan, 7^a ed, 2016.

ROSETI, L., PARISI, V., PETRETTA, M., CAVALLO, C., DESANDO, G., BARTOLOTTI, I., GRIGOLO, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering, v. 17, p. 31722-31728, 2017.

SALASZNYK, R.M., WILLIAMS, W.A., BOSKEY, A., BATORSKY, A., PLOPPER, G.E. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Journal of Biomedical Biotechnology, v. 2004, p. 24-34, 2004.

SCHAFFLER, M. B., CHEUNG, W-Y., MAJESKA, R., KENNEDY, O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. Calcified Tissue International, v. 94, p. 5-24, 2014.

SCHERBERICH, A., TUCKER, R.P., SAMANDARI, E., BROWN-LUEDI, M., MARTIN, D., CHIQUET-EHRISMANN, R. Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. Journal of Cellular Science, v. 117, p. 571-581, 2004.

SHI, Y., MA, J., ZHANG, X., LI, H., JIANG, L., QIN, J. Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. Integrative Biology, V. 7, P. 289-297, 2015.

SHI, J., CHI, S., XUE, J., YANG, J., LI, F., LIU, X. Emerging role and therapeutic implication of wnt signaling pathways in autoimmune diseases. Journal of immunology research, 2016.

SHEN, F.H., WERNER, B.C., LIANG, H., SHANG, H., YANG, N., LI, X., SHIMER, A.L., BALIAN, G., KATZ, A.J. Implications of adipose-derived stromal cells in a 3D culture system for osteogenic differentiation: an in vitro and in vivo investigation. Spine Journal, v. 13, p. 32-43, 2013.

SHI, X., DEEPAK, V., WANG, L., BA, X., KOMORI, T., ZENG, X., LIU, W. Thrombospondin-1 is a putative target gene of Runx2 and Runx3. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, p. 14321-14330, 2013.

SILVA, R. K., KRONEMBERGER, G. S., CÔRTES, I., CHARELLI, L. E., AZEVEDO, M. S., MORAIS, R. A., BAPTISTA, L. S. Improving clinical uses of mesenchymal stromal cells by 3D scaffold-free constructs. Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): Biology, Mechanisms of Action and Clinical Uses, 2016.

SOZEN, T, ÖZISIK, L., BASARAN, N. C. An overview and management of osteoporosis. European Journal of Rheumatology, v. 4, p. 46-56, 2017.

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

SUENAGA, H., FURUKAWA, K., SUZUKI, Y., TAKATO, T., USHIDA, T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 26, p. 1-9, 2015.

TAJBAKHSH, S., HAJIALI, F. A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. Materials Science and Engineering, v. 70, p. 897-912, 2016.

TAN, Y., RICHARDS, D., TRUSK, T., VISCONTI, R., YOST, M., KINDY, M., DRAKE, C., ARGRAVES, W., MARKWALD, R., MEI, Y. 3D Printing Facilitated Scaffold-free Tissue Unit Fabrication. Biofabrication, v. 6, p. 1-16, 2014.

THIEL, A., REUMANN, M. K., BOSKEY, A., WISCHMANN, J., VON EISENHART-ROTHE, R., MAYER-KUCKUK, P. Osteoblast migration in vertebrate bone. Biological Reviews, p. 1-12, 2017.

THOMPSON, EM., MATSIKO, A., FARRELL, E[.], KELLY, DJ., O'BRIEN, FJ. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 9, p. 889-902, 2014.

TSAI, A.C., LIU, Y., YUAN, X., MA, T. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. Tissue Engineering Part A, v. 21, p. 1705-1719, 2015.

TSUJI, W. RUBIN, JP., MARRA, KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. World Journal of Stem Cells, v. 6, p. 312-321, 2014.

VALENTI, MT., DALLE CARBONARE, L., MOTTES, M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, p. 1-9, 2017.

VALDES, A. M., SPECTOR, T. D. The genetic epidemiology of osteoarthritis. Current Opinion Rheumatology, v. 22, p. 139-143, 2010.

VALENTI, M.T., DALLE CARBONARE, L., MOTTES, M. Osteogenic differentiation in healthy and pathological conditions. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, p. 1-9, 2016.

VAN DEN DOLDER, J., DE RUIJTER, A.J., SPAUWEN, P.H., CANSEN, J.A. Observations on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness. Biomaterials, v. 24, p. 1853-1860, 2003.

VIDYASEKAR, P., SHYAMSUNDER, P., SAHOO, S.K., VERMA, R.S. Scaffold-free and scaffold-assisted 3D culture enhances differentiation of bone marrow stromal cells. In vitro Cellular and Development Biology, v. 52, p. 204-217, 2016.

WANG, Y., CHEN, X., CAO, W., SHI, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nature Immunology, v. 15, p. 1009–1016, 2014.

WEISS-BILKA, H.E., MCGANN, M.E., MEAGHER, M.J., ROEDER, R.K., WAGNER, D.R. Ectopic models for endochondral ossification: comparing pellet and alginate bead culture methods. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 2016, p. 1-18, 2016.

WENNBERG C, HESSLE L, LUNDBERG P, MAURO S, NARISAWA S, LERNER UH, MILLAÁ, J. L. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. Journal of Bone Mineralization Research, v. 15, p. 1879-1888, 2000.

WINTGES, K., BEIL, F.T., ALBERS, J., JESCHKE, A., SCHWEIZER, M., CLAASS, B., TIEGS, G., AMLING, M., SCHINKE, T. Impaired bone formation and increased osteoclastogenesis in mice lacking chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5). Journal of Bone and Mineral Research, v. 28, p. 2070-2080, 2013.

WOZNEY, J.M., ROSEN, V., CELESTE, A.J., MITSOCK, L.M., WHITTERS, M.J., KRIZ, R.W., HEWICK, R.M., WANG, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science, v. 242, p. 1528-1534, 1988.

WOZNEY, J.M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. Molecular Reproduction and Development, v. 32, p. 160-167, 1992.

WU, H., GORDON, JA., WHITFIELD, TW., TAI, PW., VAN WIJNEN, AJ., STEIN, JL., STEIN, GS., LIAN, JB. Chromatin dynamics regulate mesenchymal stem cell lineage specification and differentiation to osteogenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms, v. 1860, p. 438-449, 2017.

XU, H., BARNES, GT., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, CJ., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, JS., TARTAGLIA, LA., CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of Clinic Investigation, v. 112, p. 1821–1830, 2003.

XU, L., MENG, F., NI, M., LEE, Y., LI, G. N-cadherin regulates osteogenesis and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Molecular Biology Reports, v. 40, p. 2533-2539, 2013.

XU, J., LI, Z., HOU, Y., FANG, W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. American Journal of Translational Research, v. 7, p. 2527-2535, 2015.

YAMAGUCHI, Y., OHNO, J., SATO, A., KIDO, H., FUKUSHIMA, T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnology, v. 14, p. 1-10, 2014.

YOUSEFI, A-M., JAMES, P. F., AKBARZADEH, R., SUBRAMANIAN, A., FLAVIN, C., OUDADESSE, H. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. Stem Cells International, v. 2016, p. 1-13, 2015.

ZHU, F., SWEETWYNE, MT., HANKENSON, KD. PKCO Is Required for Jagged - 1 Induction of Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation. Stem Cells, v. 31, p. 1181-1192, 2013.

ZIMMERER, R. M., JEHN, P., KOKEMULLER, H., ABEDIAN, R., LALK, M., TAVASSOL, F., GELLRICH, N.-C., SPALTHOFF, S. In vivo tissue engineered bone versus autologous bone: stability and structure. International Journal Oral Maxillofacial Surgery, v. 46, p. 385-393, 2015.

ZOCH, M.L., CLEMENS, T.L., RIDDLE, R.C. New insights into the biology of osteocalcin. Bone, v. 82, p. 42-49, 2016.

ZUK, PA., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, DA., HUANG, JI., MIZUNO, H., ALFONSO, ZC., FRASER, JK., BENHAIM, P., HEDRICK, MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular Biology of the Cell, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

ANEXOS

ANEXO I – FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP NÚMERO 826/09

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO Hospital Universitário Clementino Fraga Filho Faculdade de Medicina Comitê de Ética ens Pesquisa - CEP CEP - MEMO - n.º 826/09 Rio de Janeiro, 08 de outubro de 2009. Wan Nelson Dam Videor Mides-Perf Ascents onlaw: Da: Coordenadora do CEP Zonalishpeshike Peliner Anabese Titularen A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Leandra Santos Baptista Chairc Main, Value & Handle Ampriligo-Perl Assesses Olksilajis Arbeit Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa. Anisping Toxid - Margar Hites Haryoky Approvement and holders Sr. (a) Pesquisador (a), Late & Decide & Antie Margan Enfermien-Minter Man Admin Von Real Informo a V. S.a. que o CEP constituido nos Termos da Adap Pedager Adjusti Resolução n.º 19696 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente Anto Takens, Arama read-in-Opentian registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e Noirse Constitu-Fermin Mideo-PerCAljani emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa Pakingt Bense Mider-Pel Assem páginas 001 a 029 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado: Relate Cory Public Mider-Distor DRifett T&als Sale Mides-Per Thier Protocolo de Pesquisa: 145/09 - CEP nden Septeme Ares Parts Tindak Rodulfionasi Titulo: "Isolamento e caracterização de células derivadas de National Poince Amile That Met Trys tecido adiposo e da pele de pacientes com índice de massa corporal normal e Artico - Cinema Calls Albert Calender ex-obesos visando o seu uso em protocolos de terapia celular e engenharia Medico-Perf Associado tecidual" implem: and Mentals View Area Pesquisador (a) responsável: Dra. Leandra Santos Baptista Wego-Mont Dirinite Consider Ligns Thatpart interestional Data de apreciação do parecer: 05/10/2009 MringfaClosinacion Genes . Chernest May Johnson Parecer: "APROVADO" Mile-Pol Awalah Mukilings (Accast Atko-Polear Adea-Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório Rest Mate View Rollins / semestral, previsto para 05/04/2010, anual e/ou relatório final para este upien-Polser Akets Marto Themalaty Taxana Source Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da printing dis Unities Resolução n. * 196/96 - CNS/MS). Distinger. Moko-Pell Adjents Atenciosamente,

20 Henrunt

Prof[®]. Alice Helena Dutra Violante Coordenadora do CEP

ANEXO II – Artigo científico aceito para publicação

[Frontiers In Bioscience, Landmark, 23, 1969-1986, June 1, 2018]

Spheroids of stem cells as endochondral templates for improved bone engineering

Leandra S. Baptista^{1,2,3,4}, Gabriela S. Kronemberger^{1,3,4}, Karina R. Silva^{1,2,3,4}, Jose M. Granjeiro^{1,2,3,5}

1Laboratory of Bioengineering, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. 2Post-graduation Program in Biotechnology, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, 3Post-graduation Program of Translational Biomedicine (Biotrans), Unigranrio University - Campus I, Brazil, 4Nucleus of Multidisciplinary Research in Biology (Numpex-Bio), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) Xerem, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, 5Laboratory of Clinical Research in Odontology, Fluminense Federal University (UFF), Niteroi, Brazil.

TABLE OF CONTENTS

- 1. Abstract
- 2. Introduction
- 3. The Biology of endochondral ossification
- 4. Tissue engineering
 - 4.1. Top-down tissue engineering
 - 4.2. Bottom-up tissue engineering
- 5. Spheroids
 - 5.1. Techniques for spheroid formation
 - 5.2. Spheroids for bone engineering
 - 5.3. Spheroids as a template for endochondral ossification
- 6. Spheroids in 3D bioprinting
- 7. Summary and perspectives
- 8. Aknowledgements
- 9. References